

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ELISANDRO CÉSAR BRUSCATO

Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos na Descoloração de
Corantes da Indústria Têxtil

Curitiba

2011

ELISANDRO CÉSAR BRUSCATO

Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos na Descoloração de
Corantes da Indústria Têxtil

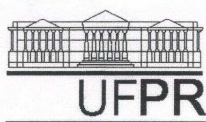
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Kava-Cordeiro.

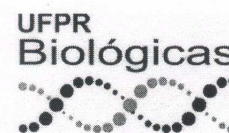
Co- Orientador: Prof. Dr. Jaime Paba

Curitiba

2011



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **Elisandro César Bruscato** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 18 de fevereiro de 2011

Profa. Dra. Michele Rigon Spier

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR
Membro Titular

Profa. Dra. Lygia Vitória Galli-Terasawa

Departamento de Genética da UFPR
Membro Titular

Profa. Dra. Vanessa Kava-Cordeiro

Departamento de Genética da UFPR
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Jaime Paba

Departamento de Bioquímica da UFPR
Membro Titular

Visto:

Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler

Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores Vanessa Kava-Cordeiro e Jaime Paba, pela orientação, idéias, paciência e ensinamentos.

A Doutoranda e amiga Carolina Heyse Niebisch pelas idéias, conselhos e ajuda para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Arlindo e Célia pela confiança de sempre.

Aos meus irmãos Alexandre, Cícero e Giovanna e meus sobrinhos Matheus, Vittória, Lorenzo e Beatriz.

Aos meus amigos do LabGeM, principalmente ao Douglas, Eduardo, Josiane, Renata, Juliana, Lisandra, Daiani, Yuri, Vivian, Camila, Alan, Arthur e Felipe pela boa convivência e risadas durante o tempo que passamos no laboratório.

Ao técnico do LabGeM Maicon pelo auxílio nas preparações de soluções e meios de cultura.

Aos meus amigos Marcello, Aline, Leonardo, Ricardo, Luiz Augusto, Vagner, Paula, Danielle, Luis Felipe, Luiz Fernando, Laercio, Rui César, Fernanda, Lianna e Natascha, pelas conversas, piadas e risadas neste período.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética em especial a Prof^a.Dr^a. Maria Luiza Petzl-Erler e ao Prof. Dr Ricardo Lehtonen R. de Souza respectivamente coordenadora e vice coordenador do Programa.

Ao programa REUNI pelo auxílio financeiro.

“wyrd bid ful āraed. O destino é inexorável.”

Bernard Cornwel

RESUMO

O aumento na produção de corantes têxteis acarreta grandes problemas ambientais principalmente em corpos d'água, através dos resíduos formados após tingimento das fibras. Com a baixa eficiência dos métodos atualmente aplicados para a eliminação destes resíduos, a biodegradação tornou-se uma alternativa para combater este tipo de poluição. Dentre os organismos utilizados, os fungos apresentam um grande potencial por estarem naturalmente presentes em áreas degradadas e muitos deles produzirem enzimas que degradam moléculas xenobióticas. Microrganismos endofíticos vêm sendo investigados para aplicação em diferentes áreas de interesse biotecnológico. Neste trabalho, de 35 isolados de fungos endofíticos avaliados, cinco (48J, 14JA, 3HAI, 1IIG, BB1) apresentaram potencial para descoloração do corante Remazol azul. Os isolados foram obtidos a partir da planta medicinal "Espinheira-santa" (*Maytenus ilicifolia*) e correspondem ao gênero *Pestalotiopsis*. Destes, dois isolados denominados 14JA e 48J foram selecionados para estudos aprofundados por apresentarem potencial de descoloração superior a 50%. Diferentes condições nos meios de cultura foram testados utilizando a avaliação por superfície de resposta para cada um dos isolados selecionados, visando melhores resultados no processo de descoloração. Para o isolado 14JA, a melhor composição do meio foi com 5g/L de galactose como fonte de carbono, 15g/L de uréia como fonte de nitrogênio e 1mM de cobre e 5mM de manganês suplementando o meio, com pH 7,6, além dos ingredientes usuais e para o isolado 48J, 1g/L de galactose, 15g/L de tartarato de amônio em pH 6. A temperatura de incubação foi de 28°C. A atividade descorante do micélio do meio chegou a 53% para o isolado 14JA e 57% para o isolado 48J. A atividade descorante destes isolados é oriunda da ação de uma lacase, associada ao micélio. Com o objetivo de identificar os isolados utilizados em nível de espécie, foram sequenciadas as regiões ITS, β -tubulina e EF ("Elongation Factor"). As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados do *Genbank* e os resultados obtidos para as três regiões não foram coincidentes para a identificação das espécies. Os dados de sequências ITS para este gênero são mais abundantes enquanto as sequências de EF mais raras, sendo assim, foram utilizadas principalmente os resultados das regiões ITS sequenciadas para a identificação das espécies. O isolado 48J apresentou identidade genética de 100% com *Pestalotiopsis vismae*. Os outros isolados, 14JA, 3HAI, 1IIG e BB1, apresentaram identidade genética entre 97 a 99% com *Pestalotiopsis mangiferae*. O sequenciamento das outras regiões (EF e Beta-tubulina) resultou em identidade genética com outras espécies de *Pestalotiopsis*. Devido à complexidade taxonômica deste gênero, não foi possível concluir com certeza a que espécie estes isolados pertencem.

Palavras- chaves: Biodegradação. Corantes têxteis. Fungos endofíticos. *Pestalotiopsis*.

Abstract

The increase in production of textile dyes causes huge environmental problems mainly in water bodies through waste formed after dyeing of the fibers. With the low efficiency of the methods currently used for the disposal of these wastes, biodegradation has become an alternative to tackle this kind of pollution. Among the organisms used, the fungi show great potential because they are naturally present in degraded areas and produce many enzymes that degrade xenobiotic molecules. Endophytic microorganisms are being investigated for application in different areas of biotechnological interest. In this study, 35 isolates of endophytic fungi evaluated, five (48J, 14JA, 3HAI, 1IIG, BB1) had potential for decolourisation of Remazol blue. The isolates were obtained from the medicinal plant "Espinheira-santa" (*Maytenus ilicifolia*) and correspond to the genus *Pestalotiopsis*. Of these, two isolates called 48J and 14JA were selected for detailed studies for a potential of more than 50% discoloration. Different conditions in the culture media were tested using the assessment response surface for each of the selected isolates, to obtain better results in the bleaching process. To isolate 14JA, the best medium composition was 5g / L of galactose as carbon source, 15g / L of urea as nitrogen source and 1mM 5mM copper and manganese by supplementing the medium with pH 7.6, plus of the usual ingredients and to isolate 48J, 1g / L of galactose, 15 g / L of ammonium tartrate at pH 6. The incubation temperature was 28 ° C. The bleach activity of the mycelium of the medium reached 53% for isolated 14JA and 57% for strain 48J. The bleach activity of these isolates come from the action of a laccase associated with the mycelium. Aiming to identify the isolates used in the species level, we sequenced the ITS region, β -tubulin and EF (Elongation Factor). The sequences were compared with the Genbank database and the results for the three regions were not synchronized to the identification of species. Data from ITS sequences for this genus are more abundant as the sequences of EF rarer, so the results were mainly used ITS regions sequences for species identification. The isolate 48J showed 100% genetic identity with *Pestalotiopsis vismae*, the other isolates, 14JA, 3HAI, BB1 1IIG and showed genetic identity between 97 to 99% with *Pestalotiopsis mangiferae*. The sequencing of other regions (EF and beta-tubulin) resulted in genetic identity with other species of *Pestalotiopsis*. Due to the taxonomic complexity of this kind, we could not conclude with certainty that these isolates belong to species.

Keywords: Biodegradation. Textile dyes. Endophytes. *Pestalotiopsis*.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Estrutura química da mauveína.....	5
Figura 2: Estrutura química do corante vermelho congo, contendo um grupo diazo como grupo cromóforo.....	7
Figura 3: Estrutura química do corante azoico corante Marrom Bismark.....	7
Figura 4: Estrutura química do corante ácido corante Amarelo de metanil.....	8
Figura 5: Estrutura química do corante à cuba corante Índigo Azul.....	8
Figura 6: Estrutura química do corante disperso <i>Cibacete Brilliant Blue</i>	8
Figura 7: Estrutura molecular típica de corantes pré-metalizado.....	9
Figura 8: Estrutura molecular de corante reativo.....	9
Figura 9: Aspecto de conídio de <i>Pestalotiopsis</i>	21

Lista de Quadros

Quadro 1: Algumas classes de corantes de acordo com o <i>Colour Index</i> (C.I).....	6
Quadro 2: Componentes encontrados em efluentes da indústria têxtil.....	12
Quadro 3: Métodos utilizados para remoção de corantes.....	14
Quadro 4: Microrganismos endofíticos com importância biotecnológica.....	20

Abreviaturas e símbolos

μmol – micromol

ABTS – 2,2'-azinobis (3- etilbezotiazolina-6-sulfonato)

BDA – meio Agar batata dextrosada

C.I. – Colour Index

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente,

COR – corante

DQO – demanda química de oxigênio

Lac – lacase

LMEs – enzimas modificadoras de lignina

MML – meio mínimo líquido

MMS – meio mínimo sólido

N- nitrogênio

UD – unidade descorante

UE – unidade de enzima

UV- Ultra violeta

vis –visível.

Sumário

RESUMO.....	5
Abstract	6
Lista de Ilustrações	7
Lista de Quadros	8
Abreviaturas e símbolos	9
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Corantes Têxteis.....	14
3.2 Poluição e Toxicidade de Corantes Têxteis.....	19
3.3 Tratamentos de Efluentes da Indústria Têxtil.....	21
3.4 Biodegradação e Biorremediação.....	25
3.5 Fungos e a biodegradação	26
3.6 Fungos endofíticos	27
3.7 Gênero <i>Pestalotiopsis</i>	30
4. REFERÊNCIAS.....	33
ARTIGO.....	39

1 INTRODUÇÃO

O problema da poluição ambiental tem caráter mundial e originou-se na revolução industrial. Teve uma maior intensidade com a explosão populacional humana, acompanhando o modelo social, econômico e cultural. Segundo Balan (2002), em muitas regiões brasileiras que abrigam pólos industriais e que tem uma densa população, o ecossistema aquático vem sofrendo uma grande degradação, efeito causado pelos efluentes industriais. Mais de 700 mil toneladas de dez mil tipos de corantes e pigmentos são produzidos anualmente em todo o planeta e destes, cerca de 20% são descartados em efluentes durante o beneficiamento têxtil (ZANONI; CARNEIRO, 2001). Braile e Cavalcanti (1993) relataram que os efluentes têxteis possuem características variadas e diferentes composições, que dependem do tipo de corante utilizado em cada caso e do processo de coloração da fibra. Essas características aliadas às modificações introduzidas para aumentar sua estabilidade a fatores bióticos e abióticos dificultam sua degradação ou remoção do meio ambiente

A questão do descarte de resíduos no ambiente é um problema sem solução adequada para muitos casos, pois estes apresentam difícil degradação pelas tecnologias convencionais (MEYER, 1978). Alternativas têm sido desenvolvidas para o tratamento de resíduos de diferentes características, os quais englobam processos físico-químicos ou biológicos. Dentre os processos biológicos, vários organismos podem ser utilizados na degradação de corantes como: bactérias, fungos ou plantas. A eficiência de um ou outro depende em muitos casos da estrutura da molécula, da presença de enzimas hábeis para degradar o poluente e da suscetibilidade destas as condições de temperatura, pH, entre outros fatores do ambiente onde ela deve agir.

A biodegradação é um processo que vem sendo investigado pelas possibilidades de evitar a contaminação do ambiente. Quando este já está contaminado, a busca é por estratégias de biorremediação. Esta consiste na aplicação de processos biológicos no tratamento de resíduos para recuperar e regenerar ambientes poluídos, principalmente solos e água. A utilização de

microrganismos selecionados é uma das técnicas mais utilizadas, pois aceleram o processo de degradação da matéria.

Os microrganismos, especialmente os fungos, têm grande potencial de uso em processos de biodegradação e biorremediação. Trabalhos avaliando o potencial biotecnológico de fungos endofíticos vêm se tornando mais frequentes, principalmente a partir da década de 90, devido a resultados promissores na produção de metabólitos secundários com interesse industrial. O processo co-evolutivo dos fungos endofíticos com seus hospedeiros proporcionaram o desenvolvimento de características únicas. Com o intuito de manter uma simbiose estável, os fungos endofíticos secretam inúmeras variedades de enzimas que contribuem com sua colonização e crescimento, algumas destas ainda desconhecidas (WANG; DAI, 2010).

Considerando as particularidades dos fungos endofíticos o presente trabalho buscou avaliar o potencial desses fungos na descoloração e possível biodegradação de corantes da indústria têxtil e dos isolados selecionados identificá-los ao nível de espécie e averiguar possíveis relações filogenéticas entre eles.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico na descoloração de corantes têxteis

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar fungos endofíticos capazes de descolorir corantes têxteis.
- Identificar a biomolécula responsável pela degradação intra ou extracelular.
- Aperfeiçoar as condições de cultivo para a produção de biomoléculas associadas à atividade descorante quanto a fonte de carbono, nitrogênio, suplementação de micronutrientes, temperatura, pH e presença de indutores nos meios de cultivo.
- Caracterizar algumas biomoléculas envolvidas no processo.
- Avaliar o perfil de expressão de enzimas degradadoras na fração ativa do fungo crescido em diferentes condições de cultura.
- Identificar as espécies dos fungos com potencial biodegradador pelo sequenciamento parcial dos genes da beta tubulina, fator de elongação e região *Internal Transcribed Spacer*. ITS1-5,8S- ITS2.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Corantes Têxteis

A indústria de corantes sintéticos foi introduzida no Brasil após a 1ª Guerra mundial e supre cerca de 60% de toda a demanda da indústria nacional. Segundo a Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUM, 2011) o Brasil é responsável por 2,6% da produção mundial de corantes, sendo que 57% representam a produção de corantes reativos e 35% a de corantes dispersos encontrados no mercado. Cerca de três quartos da indústria estão localizados na região Sul (Santa Catarina), Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e Nordeste (Pernambuco, Bahia e Ceará) (GUARATINI; ZANONI, 1999). No período compreendido entre os anos de 2002 e 2007, a importação de corantes no Brasil sofreu um acréscimo de aproximadamente 80%, já a exportação praticamente dobrou, porém a taxa de exportação ainda é consideravelmente muito menor que a importação (ABIQUM, 2011).

No processo de coloração da fibra têxtil, três etapas são consideradas mais importantes na geração de poluentes: montagem, fixação e tratamento final.

- Montagem: é a etapa onde a fibra entra em contato com a solução de corante (banho de tingimento) ou é impregnado com corantes através de forças mecânicas (impressão, estampa).
- Fixação: nesta etapa o objetivo é a reação entre o corante e o tecido.
- Tratamento final: a última etapa consiste em lavagem em água corrente que retira o excesso de corante original ou não fixado à fibra têxtil, sendo a quantidade de corante perdido dependendo da classe ao qual ele pertence (ALCÂNTARA; DALTIM, 1996; GUARATINI; ZANONI, 1999).

A origem dos corantes é incerta, mas há indicações de seu uso em amostras de tecidos de tumbas egípcias e antigos hieróglifos datados de 2500 a.C. Até a metade do século XIX só existiam pigmentos naturais provenientes de vegetais (urucum), insetos (cochonilha), moluscos (*Murex*) e minerais (óxido

de ferro), cujas fórmulas de extrações e aplicações eram guardadas secretamente (ABIQUIM, 2011). A grande revolução na história dos corantes aconteceu quando o químico inglês Willian Henry Perkin em 1856, tentando sintetizar quinina, uma agente anti-malária por oxidação da anilina, sintetizou o primeiro corante, a mauveína conhecida também como púrpura de anilina (Figura 1) (AMORIM DA COSTA, 2007). Este foi o primeiro passo para a produção de corantes orgânicos sintéticos em grande escala (ZANONI; CARNEIRO, 2001). Entretanto, muitos corantes naturais como o índigo, a alizarina e a henna, utilizados na antiguidade ainda são empregados em larga escala.

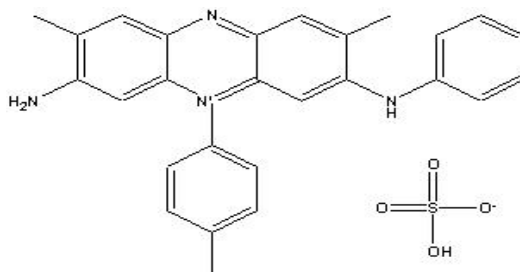


Figura 1: Estrutura química da mauveína

Fonte: <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html>

Os corantes têxteis são compostos orgânicos, cuja finalidade é conferir a uma fibra uma determinada cor. Esta tem que estar em uma condição preestabelecida, reagindo ou não com o material durante o tingimento. Os corantes são solúveis, não abrasivos e mostram alta capacidade de absorção luminosa. A molécula de corante pode ser dividida em duas principais partes, um grupo cromóforo (que dá a cor) e uma estrutura responsável pela fixação do corante a fibra do tecido que é chamada de auxocromo (KUNZ *et al.*, 2002).

Observando que muitos corantes são compostos complexos, muitas vezes sendo impossível traduzir para uma fórmula química (alguns são misturas de vários compostos e outros não possuem estrutura química definida). Por esse motivo, sua nomenclatura química usual raramente é utilizada, preferindo seu nome comercial. Para poder identificar os mesmos corantes comercializados com diferentes denominações, utiliza-se o *Colour*

Index (C.I.) (Quadro 1), que é o catálogo da *American Association of Textile Chemists and Colourists* e da *British Society of Dyers and Colourist*. O C.I. classifica sistematicamente os corantes de acordo com sua estrutura química (definida pelos grupos cromóforos), quando conhecida. Com essa classificação os corante e pigmentos podem ser divididos em 26 tipos, e há registros de mais de oito mil corantes orgânicos sintéticos associados à indústria têxtil (WESENBERG, KYRIAKIDES, AGATHONS, 2003). De acordo com Zanoni e Carneiro (2001), os corantes apresentam estruturas moleculares complexas que podem envolver até 500 reações. Geralmente apresentam um grupo cromóforo (nitro, nitroso, azo e carbonila) que é responsável pela cor e grupos auxiliares (etila, nitro, amino, sulfônico, hidroxila, metoxi) que proporcionam sua afinidade pela fibra têxtil natural ou sintética.

Os corantes sintéticos são classificados por sua estrutura química, ou ainda pela aplicação ao qual são destinados. Com base na estrutura química eles podem ser classificados em: nitrofenol, nitrosofenol, azo, triarilmetano, antraquinona, ftalocianina, vinilsulfônico, pirimidina e triazina. Já por aplicação são classificados de acordo com o tipo de fibra que está para ser corada.

Quadro 1: Algumas classes de corantes de acordo com o *Colour Index* (C.I.).

Código	Classe Química	Código	Classe Química
10,000	Nitroso	42,000	Triarilmetano
10,300	Nitro	45,000	Xanteno
11,000	Monoazo	55,000	Lactona
20,000	Diazo	56,000	Aminocetona
30,000	Triazo	57,000	Hydroxicetona
35,000	Poliazo	58,000	Antraquinona
37,000	Azóico	73,000	Índigo
53,000	Súlfur	74,000	Natural
40,800	Carotenóide	75,000	Base de oxidação
41,000	Difenilmetano	76,000	Inorgânico

fonte: adaptado de WESENBERG, KYRIAKIDES, AGATHONS, 2003.

Segundo Guaratini e Zanoni (1999) os principais grupos de corantes classificados pelo modo de aplicação são:

- Corantes diretos: solúveis em água e capazes de tingir fibras de celulose (algodão, viscose) através de interações de Van der Waals. Esta classe é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo ou pré- transformada em complexos metálicos. Um exemplo é o corante vermelho congo (Figura 2).

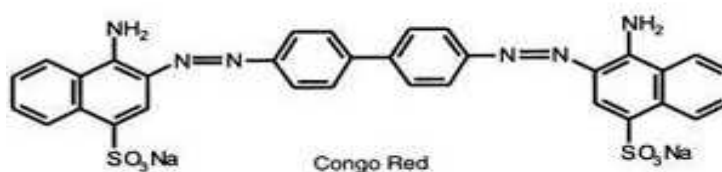


Figura 2: Estrutura química do corante vermelho congo, contendo um grupo diazo como grupo cromóforo, Catanho,M; Malpass,G.R.P; Motheo, A.J, 2006

- Corantes azóicos: compostos insolúveis em água, que apresentam ligações azo (ligação -N=N-) ligadas a sistemas aromáticos. Durante o processo de tingimento a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, chamado de agente de acoplamento. Um exemplo é o corante Marrom Bismark (Figura 3).

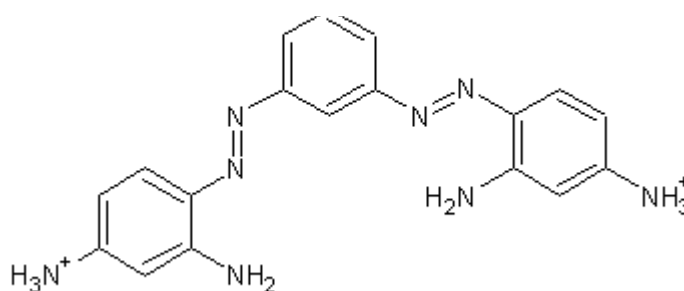


Figura 3: Estrutura química do corante Marrom Bismark.
Fonte: <http://proteomics.dynalias.org/reference/histo.html>

- Corantes ácidos: ligam-se à fibra através de troca iônica envolvendo um par de elétrons livre dos grupos amino e carboxilatos das fibras protéicas, na forma não protonada. Caracterizada por estruturas

químicas baseadas em grupos azo, antraquinona, triarilmetano, entre outros. Um exemplo é o corante Amarelo Metanil (Figura 4).

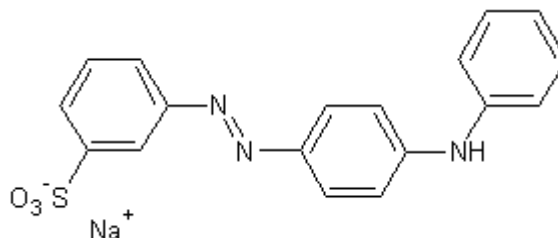


Figura 4 Estrutura química do corante Amarelo metanil.
Fonte: <http://proteomics.dynalias.org/reference/histo.html>

- Corantes à cuba: praticamente insolúveis em água, entretanto durante o processo de tintura são reduzidos, tornando-se solúveis e posteriormente oxidados, regenerando a forma original do corante a fibra. Um exemplo é o corante Índigo Azul (Figura 5).

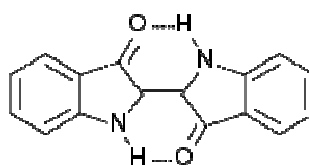


Figura 5: Estrutura química do corante Índigo Azul.
Fonte: <http://diariodeumquimicodigital.com/?tag=biografias>

- Corantes de enxofre: compostos macromoleculares com pontes dissulfeto, altamente insolúveis. Um exemplo é o corante Amarelo Claro *Brysulf*.
- Corantes dispersos: corantes insolúveis em água, aplicados em fibras de celulose, através de suspensão. Usualmente o processo de tingimento ocorre na presença de agentes dispersantes que normalmente estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato entre o corante e a fibra hidrofóbica. Um exemplo é o corante *Cibacete Brilliant Blue* (Figura 6).

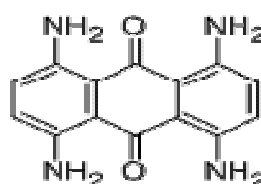


Figura 6: Estrutura química do corante *Cibacete Brilliant Blue*.
Fonte: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB9133956_EN.htm

- Corantes pré-metalizados: caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao grupo azo, permitindo a formação de complexo com íons metálicos (Figura 7).

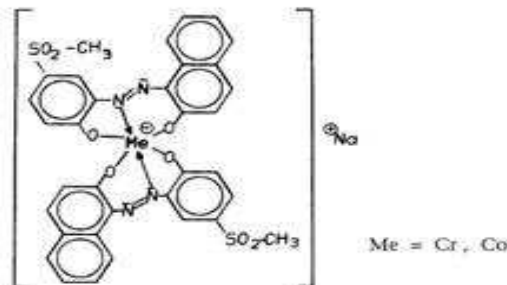


Figura 7: Estrutura molecular típica de corantes pré-metalizados.

Fonte: http://aida.ineris.fr/bref/bref_text/breftext/anglais/bref/BREF_tex_gb48.html#_Ref50304193

- Corantes reativos: são corantes que apresentam um grupo eletrofílico capaz de formar ligações covalentes com grupos hidroxilas das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos aminos das poliamidas. Os principais apresentam grupos azo (-N=N-) e antraquinona como cromóforos. Dentre os corantes reativos encontra-se o corante Remazol Azul, C.I. *Reactive blue 220* (RB220), que apresenta em sua estrutura complexos de cobre e formazana (Figura 8).

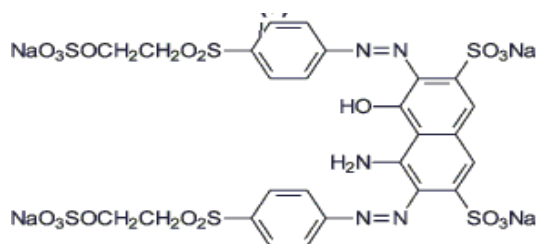


Figura 8: Estrutura molecular de corante reativo.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-422006000500018&script=sci_arttext

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente nos corantes, mas sem dúvida os mais representativos e largamente utilizados são os da família dos azos corantes (KUNZ,2002).

3.2 Poluição e Toxicidade de Corantes Têxteis

Segundo Nigam *et al.* (2000), em decorrência a sua própria natureza a presença de quantidades muito pequenas de corantes já tornam o efluente

colorido. Aumentando-se a turbidez da água e consequentemente impedindo a penetração de luz solar, estes rejeitos diminuem a atividade fotossintética de alguns organismos provocam distúrbios na solubilidade dos gases e causam danos nas brânquias dos organismos aquáticos.

A toxicidade avaliada em microrganismos biosensores é extremamente variada. Dos mais de três mil corantes analisados quanto à toxicidade sobre peixes e mamíferos foi constatado que menos de 2% deles apresentaram uma toxicidade considerada, sendo que os corantes básicos, em ambos os casos foram os que apresentaram maior toxicidade (ZEE, 2002).

Nilsson *et al.* (1993) sugere que os riscos à saúde humana variam de acordo com o tempo de exposição aos corantes, alguns compostos do corante que não são totalmente incorporados ao tecido podem causar dermatites e problemas respiratórios como asma e rinite alérgica. Uma vez ingeridos, os corantes apresentam maiores riscos relacionados às etapas de biotransformação (caminho do metabolismo destes corantes nos organismos), pois quando estes são catabolisados por enzimas específicas, podem gerar substâncias com propriedades carcinogênicas e mutagênicas (HUNGER, 1994). Rajaguru *et al.* (1999) relatou que corantes são potenciais causadores de quebras cromossômicas, quando sua clastogenicidade foi avaliada em células de medula óssea de ratos. Isso indica que a exposição ou ingestão deste corante ou seus metabólitos, podem representar altos riscos aos trabalhadores da indústria têxtil e de corantes que podem de alguma forma se contaminar através do contato destas substâncias com a pele ou até pela ingestão involuntária destas substâncias. De acordo com Spadar, Gold e Renganathan, (1992) os principais corantes que apresentam algum potencial carcinogênico são os que pertencem à classe azo.

O primeiro passo na redução catabólica de corantes azóicos é sempre acompanhada por uma diminuição na absorção de luz visível e pela geração de aminas aromáticas, algumas delas conhecidas como potenciais agentes carcinogênicos. Estas aminas foram encontradas na urina de trabalhadores e de animais de laboratório após administração de corantes azóicos (SWEENE, CHIPMAN, FORSYTHE, 1994). Alguns estudos têm relacionado um aumento

no risco de câncer de bexiga por trabalhadores da indústria têxtil expostos aos corantes (DOLIN, 1992; NOTANI, SHAH, BALAJRISHNAN, 1993; MASTRANGELO *et al.*, 2002), aumento de câncer pancreático (ALGUACIL *et al.*, 2000) e câncer de sistema digestório (MASTRANGELO *et al.*, 2002). Vineis e Pirastu (1997) relataram que a exposição de trabalhadores a aminas aromáticas aumentam em 25% a incidência de câncer de bexiga.

Gottlieb *et al.*(2003) relata que os efluentes da indústria têxtil, mesmo após tratamentos que resultem na descoloração, não podem ser considerados não tóxicos, uma vez que a redução de coloração não implica em redução de toxicidade. Dentre os problemas decorrentes da não remoção de corantes encontra-se a possibilidade de alguns corantes dispersos realizarem bioacúmulo, o que significa um depósito crescente de poluentes em nível tecidual através de etapas metabolismo-dependentes (BAUGHMAN; PERENICH, 1988; AKSU, 2005).

3.3 Tratamentos de Efluentes da Indústria Têxtil

Observando a grande ocorrência de problemas ambientais causados por corantes, o governo brasileiro vem adotando várias medidas que regulamentam o lançamento de efluentes em corpos de água. Dentre as leis que governam o despejo de efluentes tem destaque a Política Nacional de Recursos Hídricos, Lei Federal nº. 10.881, de junho de 2004 que expõe sobre os contratos de gestão entre a Agência Nacional de Águas e entidades delegatárias das funções de Agências de Águas relativas à gestão de recursos hídricos de domínio da União. A Resolução nº 357 de março de 2005, instituída pelo CONAMA, estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, entre outras questões ambientais. A Lei Federal nº 12.334 de setembro de 2010 estabeleceu a Política Nacional de Segurança de Barragens destinadas à acumulação de água para quaisquer usos, à disposição final ou temporária de rejeitos e à acumulação de resíduos industriais (CONAMA, 2011).

Guaratini e Zanoni (1999) e Zanoni e Carneiro (2001) citam que o órgão internacional *The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic*

Pigments Manufacturers (ETDA), criado em 1974, tem o intuito de minimizar os possíveis danos causados ao homem e ao meio ambiente, pela fiscalização da fabricação e do uso de corantes sintéticos. Porém este controle ainda tem falhas, principalmente em países em desenvolvimento. A natureza química variada dos corantes e o uso rotineiro de diversos aditivos químicos durante o banho de tingimento, montagem e fixação, dificultam o processo de tratamento e remoção dos corantes com apenas um procedimento (ALCÂNTARA; DALTIM, 1996). Os principais componentes encontrados em efluentes de indústrias têxteis estão resumidos no Quadro 2.

Quadro 2: Componentes encontrados em efluentes da indústria têxtil.

POLUENTE	PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS	ORIGEM
Matéria orgânica	Amidos, enzimas, gorduras, graxas, surfactantes e ácido acético	Limpeza, lavagens, tingimento
Corantes	Corantes, impurezas da lã	Lavagem, tingimento
Nutrientes	Sais de amônia, uréia, tampões, surfactantes	Tingimento
sais	Hidróxido de sódio, ácidos minerais e orgânicos, cloreto de sódio, silicatos, sulfatos e carbonatos	Limpeza, alvejamento, tingimento, neutralização
Enxofre	Sulfatos, sulfitos e hidrosulfitos, ácido sulfúrico	Tingimento
Compostos tóxicos	Metais pesados, agentes oxidantes e redutores, biocidas, sais de amônio quaternário	Limpeza, alvejamento, tingimento, finalização

Fonte: adaptado de Ramalho, 2005.

Vários métodos podem ser utilizados na remoção de corantes de efluentes têxteis. Estes estão distribuídos em três categorias: métodos químicos, físicos e biológicos (Quadro 3). A oxidação química remove a cor de efluentes como resultado da quebra das ligações aromáticas das moléculas de corantes. Já os métodos físicos consistem em técnicas de remoção resultantes de dois mecanismos: adsorção, onde o corante é fixado a um suporte, como o carvão ativado e troca iônica, influenciados por múltiplos fatores físico-químicos (SLOKAR; LE MARECHAL, 1998; ROBINSON *et al.*, 2001).

Kumar *et al.*(1998) relatam que do ponto de vista ambiental, a maior desvantagem do processo de adsorção reside no fato dos corantes adsorvidos não serem mineralizados (degradação completa do poluente, com simultânea produção de CO₂ e H₂O), havendo, na realidade, uma transferência de poluentes de uma fase líquida para outra sólida, que terá que ser posteriormente tratada. Sendo assim, o processo de adsorção não é totalmente eficiente nem economicamente atrativo quando aplicado sozinho, mas pode ser muito útil se combinado com a redução química ou processos de biodegradação e fermentação de fase sólida.

Kunz (2002) cita que o método biológico mais utilizado é o sistema de lodo ativado, o qual consiste na agitação dos efluentes na presença de microrganismos e ar, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica. Geralmente as indústrias têxteis têm seus processos de tratamentos fundamentados na operação de processos físico-químicos de precipitação e coagulação, seguido de um tratamento biológico a base de lodos ativados. Este sistema apresenta uma eficiência relativamente alta, em torno de 80%, porém o lodo gerado não pode ser reaproveitado em decorrência da alta concentração de corantes adsorvida (ROBINSON *et al.*, 2001). Por esse motivo vem aumentando o interesse pela busca de microrganismos que são capazes de degradar de maneira eficiente estes resíduos a um baixo custo operacional.

Os corantes reativos solúveis em água e ácidos são os que apresentam mais problemas, uma vez que eles tendem a passar pelos sistemas de tratamento convencionais inalterados (WILLMOTT, GUTHRIE, NELSON, 1998). Os sistemas de tratamentos aeróbicos dependentes de atividade biológica são ineficientes na remoção destes corantes (MORAN, HALL, HOWELL, 1997). A grande preocupação com estes tipos de corantes é em decorrência da síntese destes, observando que em muitos deles são sintetizados a partir de agentes carcinogênicos conhecidos, como benzadinas e outros compostos aromáticos (BAUGHMAN; PERENICH, 1988).

Quadro 3: Métodos utilizados para remoção de corantes.

Processo	Desempenho	Limitações
Oxidação de Fenton	Total descoloração, baixo capital e custo de funcionamento.	Geração de lodo pela floculação dos reagentes e das moléculas do corante
Eletrólise	Total descoloração, baixo custo.	Tempo de vida da espuma e do eletrodo.
Flotação	Remove 90% da cor, e 40 DQO, baixo custo, compacto.	
Filtração	Alta performance, reuso de água, sais e calor.	Manuseio e descarte do material retido.
Coagulação/ floculação	Total descoloração, reuso de água.	Nem sempre efetivo, disposição de lodo.
O ₃	Total descoloração, reuso de água	Alto custo, formação de aldeídos.
Adsorção	Novos adsorventes são eféticos e com baixo custo, reuso de água.	Alta eliminação ou regeneração de custo.
Fotocatálise	Remoção da cor quase completa, desintoxicação.	Somente como passo final de polimento.
Biodegradação	Redução DQO e N.	Grande quantidade de DQO, N, cor e surfactantes no resíduo.
Sequencia anaeróbica/ aeróbica	Redução de DQO, cor e tóxicos.	Grande quantidade de resíduo de cor e DQO.
Leito fixo	Redução de DQO.	
Fungos/ H ₂ O ₂	Total descoloração.	Possível formação de produtos mais tóxicos.

Fonte: adaptado de VANDEVIVERE BIANCHI, VERSTRAETE, 1998.

Nota: DQO- demanda química de oxigênio, N- nitrogênio.

Wong e Yu (1999) relatam que apenas poucos azo corantes são degradados pela via aeróbia e que é possível degradá-los pela via anaeróbia, mas que neste processo ocorre uma redução da ligação azo que resulta na geração de amins aromáticas tóxicas, que são produtos sem cor e que são mais tóxicos que compostos iniciais. Acoplando-se sistemas anaeróbios e aeróbios consegue-se uma eficiente biodegradação de azo corantes. Nestes sistemas, os corantes azóicos são reduzidos e descoloridos anaerobicamente, produzindo amins aromáticas. Estas amins em sistemas acoplados sofrem na sequência uma degradação aeróbia, pois elas são pouco removidas em condições anaeróbias (ISIK; SPONZA, 2004).

3.4 Biodegradação e Biorremediação

À medida que o crescimento populacional avança, a administração do acúmulo de dejetos gerados pela atividade humana se torna cada vez mais uma prioridade para os grandes centros urbanos. O ambiente tem a qualidade de absorver ou transformar boa parte dos poluentes nele dispensados. Os principais processos de atenuação natural dos poluentes são: dispersão, absorção, volatilização, oxidação abiótica, hidrólise e a biodegradação. Mas destes os únicos meios efetivos de atenuação (aqueles que destroem os contaminantes ou os transformam em produtos inofensivos) são: a oxidação abiótica, a hidrólise e a biodegradação (GIANFREDA; RAO, 2004).

Segundo Banat *et al.*(1996) dentre as múltiplas estratégias aplicadas para a eliminação de corantes têxteis, a biodegradação começa a ocupar um lugar de destaque por seu apelo ecológico. Para Gianfreda e Rao (2004) a biodegradação consiste na modificação estrutural de substratos poluentes por diferentes organismos (plantas, algas, bactérias, leveduras e fungos) levando à introdução deles no fluxo normal de nutrientes na natureza.

As tecnologias de biorremediação estão recebendo grande atenção para restaurar locais muito poluídos onde a biodegradação ocorre lentamente ou é imperceptível (POINTING; 2001). De acordo com Ballaminut e Matheus (2007) os métodos de aceleração do processo de biodegradação podem utilizar microrganismos de ocorrência natural. Estes métodos podem ser melhorados em alguns casos, introduzindo microrganismos que não apresentam ocorrência natural no ambiente em questão, mas com maior capacidade de metabolizar o poluente. Os processos podem ser conduzidos no próprio local, ou fora dele, implicando assim na remoção do material contaminado (POINTING, 2001).

Segundo Pointing (2001), a biorremediação é uma tecnologia estabelecida, mas ainda a maioria dos tratamentos empregados utilizam microrganismos procariotos. Os fungos, especialmente os lignolíticos, têm despertado grande interesse devido à produção de uma diversidade de enzimas que apresentam ação sobre múltiplos substratos de origem industrial.

O uso destes organismos possibilita a expansão da biodegradação a poluentes que não consistem em substratos aos procariotos.

3.5 Fungos e a biodegradação

A utilização de fungos com propósitos biotecnológicos é bastante comum para fungos ligninolíticos. Tuomela *et al* (2000) relatou que os basidiomicetos lignolíticos atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a reciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres. Os fungos decompositores de madeira podem ser classificados em grupos ecofisiológicos como: causadores de degradação branca (*White-rot fungi*), degradação parda (*Brow-rot fungi*) e de degradação macia (*Litter-rot fungi*). Dentre esses grupos, os fungos de degradação branca são considerados os organismos mais eficientes na biodegradação de poluentes (GLENN; GOLD, 1983; PASZCZYNSKI *et al.*, 1992; SPADARO, GOLD, RENGANATHAN., 1992; POINTING, 2001). O fungo *Phanerochaete chrysosporium*, causador de degradação branca, um dos mais exaustivamente estudados, revelou a capacidade de degradar corantes azóicos, antraquinona, heterocíclicos, trifenilmetano e poliméricos (GLENN; GOLD, 1983; CRIPPS, BUMPUS, AUST, 1990, PASZCZYNSKI *et al.*, 1992; OLLIKKA *et al.*, 1993). Heinfling, Bergbauer, Szezyk. (1997) e Novotný *et al.* (2004), relatam que vários fungos de degradação branca tem capacidade de descorar diferentes classes de corantes, como exemplo os fungos *Bjerkandera adusta* e *Trametes versicolor*, que degradam diferentes corantes azo tipo reativo, ftalocianina e antraquinonas.

Segundo Mussatto, Fernandes e Milagres (2007), atualmente o uso de enzimas em processos industriais é de interesse devido a sua facilidade de obtenção através de bioprocessos e as vantagens em relação aos catalisadores químicos, como reutilização, maior especificidade, menor consumo energético, maior velocidade de reação e redução dos custos de maquinaria e laboratoriais. Duas estratégias têm sido propostas para a utilização de enzimas ligninolíticas para a degradação de compostos recalcitrantes: a transformação direta de poluentes por culturas ativas de

basidiomicetos ligninolíticos pré-selecionados, e o uso de enzimas extraídas/purificadas do meio de cultura. Contudo, a escolha da melhor estratégia irá depender dos objetivos e das condições empregadas durante o processo de biodegradação (TRUPKIN *et al.* 2003). As enzimas modificadoras de lignina (LMEs) são oxidoredutases envolvidas na degradação e mineralização da lignina, apresentam baixa especificidade, o que as torna capazes de degradar além da lignina, um amplo espectro de organopoluentes persistentes com similaridades estruturais com a lignina, dentre deles os corantes têxteis (BARR; AUST, 1994).

Segundo Gianfreda e Rao (2004) as LMEs são frequentemente expressas em diferentes combinações, isoformas e taxas, sendo que a sua síntese e secreção são induzidas por níveis limitados de carbono e/ou nitrogênio. Os principais membros deste grupo são as lacases (Lac, uma fenoloxidase), manganês peroxidases (MnP, uma peroxidase) e lignina peroxidases (LiP, uma peroxidase) (WESENBERG, KYRIAKIDES, AGATHONS, 2003). Além das LMEs, muitos outros componentes participam do sistema de degradação de lignina apresentado pelos fungos de degradação branca, dentre eles outras enzimas auxiliares produtoras de H_2O_2 , que são os substratos das peroxidases (REDDY, 1995; BANCI, CIOFI-BAFFONI, TIEN 1999; CAMERON, TOMIFEEVSKI, AUST., 2000; MESTER; TIEN, 2000; WESENBERG, KYRIAKIDES, AGATHONS., 2003; CAVALLAZZI, OLIVEIRA, KASUYA, 2004).

A quantidade e diversidade de corantes disponíveis no mercado superam a possibilidade de encontrar uma única espécie com ação sobre a maior parte destes poluentes, o que é dificultado pela presença de vários outros compostos em efluentes têxteis (EICHLEROVÁ, HOMOLKA, NERUD, 2006).

3.6 Fungos endofíticos

Segundo Stone (1988), o termo endofítico foi utilizado pela primeira vez por De Bary, em 1866, quando a usou a palavra para denominar

microrganismos capazes de colonizar tecidos internos de um vegetal. O uso do termo endofítico foi restringido para organismos que causam colonizações assintomáticas a tecidos vegetais, excluindo deste conceito fungos patogênicos e fungos mutualísticos tais como os fungos micorrízicos (CARROLL, 1988). Petrini (1991) propôs que a definição de Carroll fosse expandida para incluir todos os organismos que fossem capazes de colonizar os tecidos internos dos vegetais, sem causar qualquer dano aparente.

A constatação da presença dos fungos endofíticos pode ser realizada por exames microscópicos de tecido vegetal, pois geralmente são intercelulares ou ainda pode ser por isolamento em meios de cultura (MOORE-LANDECKER, 1996). Para o isolamento é necessário que o tecido tenha sua superfície desinfetada e então fragmentos deste tecido são colocados em meio de cultura e incubados. Algumas espécies de fungos endofíticos também podem ser identificados por PCR espécie-específica, com o uso de oligonucleotídeos iniciadores especialmente desenhados a partir de marcadores moleculares exclusivos da espécie. Nesta técnica, a partir do DNA total extraído do tecido vegetal, é feita a PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar o DNA do fungo, como o descrito para *Guignardia mangiferae*, fungo endofítico de citros (KAVA-CORDEIRO, 2004).

Petrini (1986) encontrou fungos endofíticos em todas as espécies vegetais estudadas e concluiu que todas as plantas vivas podem potencialmente ser hospedeiras destes fungos.

Os endofíticos podem desempenhar relevante função para a sanidade vegetal, já que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, no controle de insetos e até na proteção de plantas contra herbívoros (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002). Vários autores relaram o potencial que fungos endofíticos apresentam para incompatibilizar o desenvolvimento de patógenos (WHITE JR; COLE, 1985; CLARK; MILLER; WHITHEN, 1989; ARNOLD *et al.*, 2003).

Segundo Schulz *et al.* (2002), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos, como antibióticos, fungicidas e herbicidas.

A possibilidade de exploração de fungos endofíticos como produtores de metabólitos para diversos fins foi levantada por alguns pesquisadores e comprovada em certos casos. Foi detectada atividade antibiótica em 10 de 24 isolados de fungos endofíticos obtidos de cinco espécies de Ericaceae (FISHER; ANSON; PETRINI, 1984).

Um fungo muito usado na indústria biotecnológica é um fungo endofítico isolado de *Taxus brevifolia* o *Taxomyces andreanae*. Esta árvore que tem um crescimento lento é de grande importância para a produção de taxol, um agente utilizado no tratamento de câncer de mama e ovário. A planta tem uma produção baixa de taxol e a descoberta que o fungo também produz a substância fez com que novas perspectivas de obtenção desta droga surgissem ampliando o seu uso em tratamento de tumores (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

O potencial biotecnológico de microrganismos endofíticos, especialmente fungos, vem sendo investigado e constatado em vários casos, tornando promissores os estudos envolvendo estes organismos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Segundo Azevedo (2008), os microrganismos endofíticos mostram um valor na produção de fármacos, hormônios vegetais, controles de doenças em plantas cultivadas, podem causar doenças em insetos exercendo um controle natural de insetos-pragas (Quadro 4). Além de vários relatos de produção de enzimas ligninolíticas e descoloração de corantes têxteis (HAO *et al.*, 2007).

Em recente revisão sobre fungos endofíticos, Wang e Dai (2010) relataram que os endófitos são o recurso microbiano mais promissor existente atualmente, esperando para ser explorado. Durante um longo processo de co-evolução com os hospedeiros, os endófitos desenvolveram muitas características importantes e inovadoras. Para manter uma simbiose estável, eles secretam variedades de enzimas extracelulares que contribuem para a sua colonização e crescimento. Todas essas enzimas específicas, sob determinadas condições, podem ser exploradas. Além disso, os endófitos são comuns em raízes de plantas e podem afetar profundamente a composição química do solo em micro-ecossistemas. Segundo os autores o endófito pode

desempenhar um papel importante na degradação de detritos vegetais e poluentes orgânicos.

Quadro 4: Microrganismos endofíticos com importância biotecnológica.

Microrganismos	Finalidade
<i>Taxomyces andreanae</i>	Produção de antitumoral
<i>Pseudomonas</i>	Promoção de crescimento vegetal
<i>Herbaspirillum</i>	Fixação de nitrogênio
<i>Beauveria</i>	Controle de insetos
<i>Erwinia herbicola</i>	Controle de fitopatógenos
<i>Fusarium subglutinans</i>	Produção de imunossupressivos
<i>Drechslera</i>	Controle de nematóides

Fonte: adaptado de Azevedo, 2008.

3.7 Gênero *Pestalotiopsis*

Segundo o *Catalogue of Life Annual Checklists- 2010* a os fungos pertencentes ao Gênero *Pestalotiopsis* têm a seguinte classificação: Filo Ascomicota; Classe Sordariomycetes; Ordem Xylariales; Família Amphisphaeriaceae.

De acordo com Sutton (1980), os conidióforos dos *Pestalotiopsis* são produzidos dentro do corpo de frutificação compacto, denominado acérvulo. Os conídios geralmente apresentam cinco células, sendo que três delas (medianas) apresentam uma coloração marrom, e as outras duas (apical e basal) são hialinas, apresentam ainda dois ou mais apêndices apicais (JEEWON, LIEW, HYDE, 2002) (Figura 9).

Pestalotiopsis spp, podem ser um grupo de fungos com um grande potencial biotecnológico devido à produção de alguns metabólitos secundários, entre eles o taxol (STROBEL *et al.*,1997). Lee *et al.*(1996), relatam que o endofítico *Pestalotiopsis microspora*, isolado da planta *Torreya taxifolia*, produz vários compostos com propriedades antifúngica, incluindo pestalosite, pestalopirona e hidroxipestalopirona.

Figueiredo e colaboradores (2007) constataram o potencial de produção de substâncias antimicrobianas por *Pestalotiopsis* isolados da planta medicinal *Maytenus ilicifolia*.



Figura 9: Aspecto de conídios de *Pestalotiopsis*.

Fonte: <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5390074>

Hao *et al.* (2007) avaliaram a produção de lacase por *Pestalotiopsis* alterando a composição do meio de cultivo, variando as fontes e concentrações de carbono e nitrogênio. A influência de diferentes indutores e inibidores da produção de lacase também foram examinados. Segundo os autores, *Pestalotiopsis* sp. é um produtor da enzima lacase, com grande potencial de uso industrial. A lacase produzida neste trabalho foi eficaz na descoloração do corante azo *Fast Direct Blue B2RL* e o percentual de descoloração foi $88,0 \pm 3,2\%$ em pH 4,0 no prazo de 12 h.

Apesar do reconhecimento da importância crescente do gênero *Pestalotiopsis*, a identificação de isolados em nível de espécie ainda é muito complexa. Características consideradas relevantes em chaves baseadas exclusivamente na morfologia nem sempre combinam com a posição taxonômica de isolados obtida por meio de dados de sequenciamento de DNA. Em um trabalho recente, Liu *et al.* (2010) conseguiram associar a característica morfológica pigmentação das células medianas do conídio com relações filogenéticas inferidas por sequências de DNA de regiões ITS e do gene da β -tubulina.

Os fungos fitopatogênicos e endofíticos com frequência tem sua nomenclatura associada ao hospedeiro dos quais foram isolados. Jeewon; Liew e Hyde (2003) comprovaram que não há necessariamente proximidade taxonômica entre isolados de *Pestalotiopsis* do mesmo hospedeiro, após análise filogenética a partir de dados de sequenciamento de regiões ITS. Estes autores consideram a nomenclatura de espécie por associação ao hospedeiro imprópria para este gênero, desta forma torna-se evidente a necessidade de uma revisão taxonômica deste gênero (TEJESVI *et al.*, 2009).

4. REFERÊNCIAS

- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 997–1026, 2005.
- ALCÂNTARA, M. R. e DALTIN, D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 320-330, 1996.
- ALGUACIL, J.; KAUPPINEN, T.; PORTA, N. PARTANEN, T.; MALAST, N.; KOGEVINAS, M.; BENAVIDES, F.G.; OBIOLS, J.; BERNAL, F.; RIFA, J.; CARRATO, A. Risk of pancreatic cancer and occupational exposures in Spain. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 391-403, 2000.
- AMORIM DA COSTA, A. M. Mauveína a cor que mudou o mundo. **Sociedade Portuguesa de Química**. n.105 p.31-35, 2007.
- ARNOLD, A.E.; MEJIA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.;ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in atropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**,Washington, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 2003.
- AZEVEDO, J. L; Genética de Microrganismos **Editora UFG**, Goiânia 2ªed., 2008.
- BALAN, D.S.L.; Biodegradação e toxicidade de efluentes tóxicos.**Revista ABTT**, p.16- 19., 2002.
- BALLAMINUT, N. e MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 248-252, 2007.
- BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.
- BANCI, L.; CIOFI-BAFFONI, S.; TIEN, M. Lignin and Mn Peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. **Biochemistry**, v. 38, p. 3205-3210, 1999.
- BARR, D. P. e AUST, S. D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v.28, n.2, p. 78-87, 1994.
- BAUGHMAN, G. L. e PERENICH, T. A. Fate of dyes in aquatic systems: I Solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 7, p. 183-199, 1988.
- BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E.W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB,1993. 764 p.

CAMERON, M. D.; TOMIFEEVSKI, S.; AUST, D.S. Enzimology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 751-758, 2000.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklym, v.69, p. 2-9, 1988.

CATANHO, M; MALPASS, G.R.P; MOTHEO, A.J, Avaliação dos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico na degradação de corantes têxteis. **Química Nova**, v. 29, n 5, p. 983-989, 2006.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.4, p. 1118-1118, 1990.

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calyptratus*, strain CCBAS 461. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 941-946, 2006.

FIGUEIREDO, J. ; PIMENTEL, I. C.; VICENTE, V. A.; PIE, M.; KAVACORDEIRO, V. ; GALLI-TERASAWA, L. V.; PEREIRA, J. O. ; SOUZA, A. L. ; GLIENKE, C. Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 1123-1132, 2007.

FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 86, p. 153-156, 1986.

GIANFREDA, L. e RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of pollute soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 339-354, 2004.

GOTTLIEB, A.; SHAW C.; SMITH A.; WHEATLEY A.; FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 49-56, 2003.

GUARATINI, C. C. I. ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v.1, n.23, p.71-78, 1999.

HAO, J. ; SONG, F.; HUANG, F. ; YANG, C.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y; TIAN, X. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** , V. 34, n.3, p.233-240, 2007.

HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. **Chimia**, v. 48, p. 520-522, 1994.

IŞIK, M. e SPONZA, D. T. Monitoring of toxicity and intermediates of C.I. Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 14, p. 29-39,

2004.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 378–392, 2002.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, p. 372–383, 2003.

KAVA-CORDEIRO, V. **Guignardia citricarpa, G. mangiferae e Phyllosticta spinarum: caracterização morfológica, SCARs e RNA dupla fita**. Tese de doutorado, Departamento de Genética UFPR, Curitiba, 2004.

KUMAR, M. N. V. R.; SRIDHARI, T. R.; BHAVANI, K. D.; DUTTA, P. K. Trends in color removal from textile mill effluents. **Colorage**, v. 40, p. 25-34, 1998.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOSKY, E.; CLARDY, J. C. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 3232-3233, 1996.

Liu AR, Chen SC, Wu SY, Xu T, Guo LD, Jeewon R, Wei JG. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. **Molecular Phylogenetics Evolution** v.57p. 528-35, 2010.

MESTER, T. e TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 46, p. 51-59, 2000.
MEYER, U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: BROWN, A. W. A. **Ecology of Pesticides**. New York: John Wiley, 1978. 525 p.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**, 4th ed., Ed. Prentice-Hall, New Jersey, p. 501-513, 1996, 574p.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzima: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos Endofíticos: Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia**, v.5, n.29, 2002.

NIGAM, P.; ARMOUR, G.; BANAT, I. M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-absorbed agricultural residues. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 219-

226, 2000.

NILSSON, R.; NORDLINDER, R.; WASS, U.; MEDING, B.; BELIN, L. Asthma, rhinitis, and dermatitis in workers exposed to reactive dyes. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 50, p. 65-70, 1993.

NOTANI, P. N.; SHAH, P.; BALAJRISHNAN, V. Occupation and cancers of the lung and bladder: a case-control study in Bombay. **International Journal of Epidemiology**, v. 22, p. 185-191, 1993.

NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; ŠAŠEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1554-1551, 2004.

OLLIKKA, P.; ALHONMÄKI, K.; LEPPÄNEN, V.; GLUMOFF, T.; RAIJOLA, T. SIOMINEM, I. Decolorization of azo, triphenil methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4010-4016, 1993.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**, Springer Verlag, 1991, p. 179-197.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Eds.), **Microbiology of the Phyllosphere**, Cambridge, U.K. Cambridge University Press, 1986, p. 175-187.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 20-33, 2001.

RAJAGURU, P.; FAIRBAIM, L. J.; ASHBY, J.; WILLINTONG, M. A.; TURNER, S.; WOOLFORD, L. A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J. A. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 444, p. 175-180, 1999.

RAMALHO, P. A. Degradation Of Dyes With Microorganisms: Studies with Ascomycete Yeasts. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências). Braga, Portugal: Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2005.

REDDY, C. A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. **Environmental Biotechnology**, v. 6, p. 320-328, 1995.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites.

Cambridge University Press , v. 106, p. 996-1004, 2002.

SLOKAR, Y. M. e LE MARECHAL, A. M. Methods of decolorization of textile wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 37, n. 4, p. 335-356, 1998.

SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2397-2401, 1992.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, Washington, v. 260, p. 214-216, 1993.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p. 45-54, 1988.

STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E. J.; SIDHU, R. S.; SUMMERELL, B. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol producing endophyte of the *Wollemi Pine*, *Wollemia nobilis*. **Australian Journal Botanic**. v.45, p.1073-1082, 1997.

SUTTON, B. C. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. **Kew: Commonwealth Mycological Institute**, 1980, 960p.

SWEENEY, E. A.; CHIPMAN, J. K.; FORSYTHE, F. J. Evidence for direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. **Environmental Health Perspectives**, v.102, n. 6, p.119-122, 1994.

TEJESVI M.V., TAMHANKAR, S.A.; KINI, K.R.; RAO. V.S.; PRAKASH, H.S. Hylogenetic analysis of endophytic *Pestalotiopsis* species from ethnopharmaceutically important medicinal trees. **Fungal Diversity** v. 38 p. 167-183, 2009.

TRUPKIN, S., LEVIN, L., FORCHIASSIN, F. & VIALE, A. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30 p. 682-690, 2003.

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. e ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v.72, p.169-183, 2000.

VANDEVIVERE, P. C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 72, p. 289- 302, 1998.

VINEIS, P. e PIRASTU. R. Aromatic amines and cancer. **Cancer Causes and Control**, v.8, p.346-355, 1997.

WANG, Y.; DAI, C.C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology** , 2010.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHONS, S. N. White rot fungi and the enzymes for treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v.22, p. 161- 187, 2003.

WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, Lawrence, v.77, p. 323-327, 1985.

WONG, Y.; YU, J. Laccase-catalyzed decoloration of synthetic dyes. **Water Research**, v. 33, n. 16, p. 3512-3520, 1999.

ZANONI, M.V.B; CARNEIRO, P.A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, v.29, p 61- 65, 2001.

ZEE, F. P. **Anaerobic azo dye reduction**. Tese de Doutorado, 142 p., Wageningen, Holanda: Wageningen University Research Center, 2002.

Sítios Eletrônicos Consultados

ABIQUIM. Disponível em: <http://www.abiquim.org.br/>. Acesso em: 02/01/2011.

Amarelo metanil. Disponível em: <http://proteomics.dynalias.org/reference/histo.html>. Acesso em 02/01/2011.

Catalogue of life: 2010 Annual Checklist. Disponível em: http://www.catalogueoflife.org/show_species_details.php?record_id=3276395. Acesso em: 02/01/2011.

CONAMA: disponível em: <http://www.mma.gov.br/conama/>. Acesso em: 03/01/2011.

Corante *Cibacete Brilliant Blue*. Disponível em: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB9133956_EN.htm. Acesso em 03/01/2011.

Corante índigo azul. Disponível em: <http://diariodeumquimicodigital.com/?tag=biografias>. Acesso em: 03/01/2011.

Corante pré- metalizado. Disponível em: http://aida.ineris.fr/bref/bref_text/breftext/anglais/bref/BREF_tex_gb48.html#_Ref50304193. Acesso em: 03/01/2011.

Corantes e pigmentos: a química das cores. Disponível em: <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html>. Acesso em 03/01/2011.

Estrutura molecular de corante reativo. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-422006000500018&script=sci_arttext. Acesso em 03/01/2011.

ARTIGO**Potencial Biotecnológico do Fungo Endofítico *Pestalotiopsis* na Descoloração de Corantes da Indústria Têxtil.**

Elisandro César Bruscato^{1*}, Carolina Heyse Niebisch², Renata Rodrigues Gomes¹, Arthur Silva Marques¹, Felipe Borges dos Santos¹, Douglas Adamoski¹, Lygia Vitória Galli-Terasawa¹, Chirlei Glienke¹, Jaime Paba^{2**}, Vanessa Kava-Cordeiro^{1***}.

1- Departamento de Genética Universidade Federal do Paraná.

2- Departamento de Bioquímica Universidade Federal do Paraná.

*e-mail: elisandro@bruscato.com.br

**e-mail: jaimepaba@gmail.com

*** e-mail: vankava@ufpr.br

A ser submetido à revista **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** ISSN: 1367-5435

Fator de impacto: 2,086

Observação: o artigo refere-se apenas aos resultados com os fungos do gênero *Pestalotiopsis* isolados de *Maytenus ilicifolia*, e não com todos os isolados investigados neste trabalho.

Introdução

A poluição é um problema mundial, tendo sua origem na revolução industrial e maior intensidade com o aumento da população humana. Com o aumento do consumo de alimentos, produtos têxteis e outros bens, a indústria de corantes aumentou muito sua produção (Raffi *et al.*, 1990). O descarte de resíduos industriais no ambiente, com determinadas características físico-químicas, os tornam de difícil degradação pelas tecnologias convencionais (Meyer, 1978). Cerca de 10-15% de corantes têxteis utilizados durante o processo de tingimento das fibras são descarregados diretamente nos corpos d'água. Estes corantes causam uma série de problemas ambientais por causa de seus produtos intermediários, muitas vezes tóxicos, carcinogênicos e/ou mutagênicos. Alguns tratamentos dos resíduos da indústria têxtil (processos físico-químicos) se mostram ineficazes, caros e podem causar poluição secundária (Van Der Zee; Villaverde, 2005 ;Rao *et al.*, 2006). Comparando-se esses métodos com os processos biológicos de tratamento, estes foram mais eficientes baratos e corretos, em relação aos benefícios ambientais (Dafele *et al.*, 2008).

Microrganismos como bactérias, fungos, algas e leveduras podem adsorver e/ou degradar um grande número de corantes (Ren *et al.*, 2006). Vários autores relataram a degradação de corantes por fungos de degradação branca da madeira como o, *Lentinus crinitus* (Niebisch *et al.* 2010), *Phanerochaete*, *Trametes*, *Bjerkandera* e *Pleurotus* (Rigas *et al.*, 2006) e fungos endofíticos como *Pestalotiopsis sp.* (Hao *et al.*, 2006). Os fungos que realizam a degradação branca e parda possuem um grupo de enzimas que participam da degradação da lignina (Wesenberg *et al.*, 2003). Este grupo de enzimas tem uma especificidade baixa e por isso é capaz de oxidar poluentes sintéticos que apresentam similaridade estrutural com a lignina como os pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos e corantes têxteis (Asgher, 2008).

O aspecto mais importante para o sucesso do uso de microrganismo como agente de biodegradação é o meio de cultura onde é cultivado, uma vez que a composição do meio afeta significativamente a produção de enzimas ligninolíticas e por consequência, o rendimento da descoloração. A obtenção

de melhores respostas no processo de biodegradação pela variação na composição do meio por técnicas convencionais, quando um fator é avaliado a cada vez, requer uma grande quantidade de esforço e de tempo (Cazetta, 2007). Técnicas de delineamento experimental podem auxiliar na otimização das condições de cultura, uma vez que pode fornecer modelos estatísticos que revelam a interação entre os parâmetros do processo, sejam eles físicos ou químicos em vários níveis. A metodologia de superfície de resposta é amplamente utilizada para melhorar o rendimento do produto e reduzir o tempo de desenvolvimento e os custos dos meios ideais (Ghanem *et al.*, 2000; Senthilkumar *et al.*, 2005).

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de biodegradação de corantes têxteis do fungo endofítico *Pestalotiopsis sp.* e buscando as melhores condições de cultura para a produção das enzimas envolvidas no processo. Os isolados selecionados tiveram regiões de seus genomas sequenciados com o propósito de identificação das respectivas espécies.

Materiais e Métodos

Organismos e Condições de Cultura

Nove isolados do fungo endofítico do gênero *Pestalotiopsis* foram utilizados. Estes foram obtidos da planta medicinal “Espinheira-Santa” (*Maytenus ilicifolia*), do Centro Nacional de Pesquisa de Floresta (CNPQ) da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada no município de Colombo, Paraná. Estes isolados estão depositados na coleção de culturas do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e são denominados de 14JA, 48J, 11A1; 11IG; 1SD1; 1SF1; 2IF; 3HAI e BB1. Os isolados foram cultivados em placas contendo meio mínimo sólido (MMS) (6,0 g/L NaNO₃; 1,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L KCl; 0,5 g/L MgSO₄; 0,01 g/L FeSO₄-7H₂O; 0,02 g/L, ZnSO₄-7H₂O; ágar bacteriológico 1,5% (p/v) geralmente em pH 6,8. O meio mínimo líquido (MML) tem a mesma composição excluindo-se o ágar, e para meio contendo corante

foram adicionados 0,1 g/L deste no meio. Após 7 dias de crescimento micelial em MMS, dois discos de 8 mm de diâmetro foram cortados com um furador de rolha e inoculados em 5 mL de MML contendo corante. As culturas foram incubadas a 28°C durante 15 dias em todos os ensaios. Após o micélio foi retirado, lavado e centrifugado para que houvesse apenas micélio sem sobra de meio de cultura ou coloração.

Controles

Todos os controles foram feitos nas mesmas condições dos experimentos descritos a seguir, porém sem o inóculo do fungo.

Corantes e reagentes químicos

Corantes têxteis Remazol: reativo azul 220 (RB220), reativo vermelho 198 (RR198) e reativo amarelo ouro (RY107) foram fornecidos por DyStar (São Paulo, Brasil). 2,2-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e álcool veratril foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Todos os produtos químicos utilizados foram do mais alto grau de pureza disponível e de grau analítico.

Ensaio de descoloração

A medição da absorbância dos sobrenadantes das amostras foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV-160A UV-vis, e utilizada para inferir a descoloração em cultura realizada pelos fungos. A porcentagem de descoloração em cultura foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Descoloração em cultura} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{cultura}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde A_{cultura} é a absorbância a 600 nm do sobrenadante e A_{controle} é a absorbância a 600 nm do sobrenadante de culturas não inoculadas contendo o corante. Os resultados são médias de, no mínimo, três replicas.

Alternativamente foi avaliada a atividade descorante, a qual consiste na medição do consumo do corante, após um período de 24 horas, quando aos sobrenadantes e micélios derivados de culturas líquidas com 15 dias de crescimento, foram adicionadas as soluções contendo RB220. A 1 mL de sobrenadante foi adicionado 0,1 mL da solução de sais de corante a 1,1 g/L. Já o micélio foi incubado com 1,1 mL de solução de corante a 0,1 g/L. A atividade descorante foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade descorante (\%)} = \frac{A_0 - A_{24}}{A_0} \times 100$$

Onde A_{24} é a absorbância a 600 nm após 24 horas de incubação e A_0 é a absorbância inicial da mistura reacional.

Suplementação com fontes de carbono e nitrogênio

Cinco fontes de carbono foram adicionadas ao meio inicial sendo elas amido, frutose, glucose, sorbitol e galactose. Também foram testadas três fontes de nitrogênio: nitrato de sódio, uréia e tartarato de amônia. As concentrações utilizadas para os dois testes foram de 5, 10 e 15 g/L e, alternativamente, foram avaliadas duas concentrações adicionais (0,1 e 1g/L).

Fração ativa e mecanismo responsável pela descoloração

Para averiguar se o micélio é responsável pela descoloração e aferir se esta atividade é decorrente de ação enzimática foi seguido o protocolo descrito a seguir. O micélio fresco resultante de 15 dias de incubação, na melhor condição de cultura para cada isolado selecionada após os ensaios com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, foi avaliado quanto à atividade descorante, na presença e ausência de azida sódica (0,44 mol/L), e alternativamente com o micélio autoclavado a 121°C com 1atm de pressão por 20 minutos.

Efeito da temperatura, pH, suplementação de cobre, manganês e indutor

Para estes ensaios foram utilizadas as melhores fontes e concentrações de carbono e nitrogênio para eficiência de descoloração. A influência dos parâmetros temperatura, pH, suplementação com cobre, manganês e o efeito de álcool veratril, indutor da produção de enzimas modificadoras de lignina (LMEs), no processo de otimização foi analisada através de um planejamento experimental estatístico. Para isto, foi proposto um delineamento fatorial de Box-Behnken com três níveis, cinco fatores para cada fator/variável compostos por 46 experimentos (BOX; BEHNKEN, 1960) empregando-se a metodologia de superfície de resposta (BEZERRA et al., 2008) para a otimização das condições de cultivo. Estas análises foram desenvolvidas com utilização do *software* “Design Expert” 8.0.4. Trial (Stat-Ease, Inc.) e os níveis decodificados adotados para cada variável estão apresentados no Quadro 1.

Os resultados foram analisados através do coeficiente de determinação (R^2), análise de variância (ANOVA) e superfície de resposta. Quando necessário, um método de regressão não-linear foi utilizado para ajustar o polinômio de segunda ordem aos dados experimentais e identificar os termos do modelo em questão.

Fator	Nome	Unidade	Níveis dos fatores		
			Baixo(-1)	Ponto central(0)	Alto(+1)
A	Temperatura	° C	21	28	35
B	pH		6	6,8	7,6
C	Cobre	mM	0	0,5	1
D	Manganês	mM	0	2,5	5
E	Álcool veratril	mM	0	1	2

Quadro 1 – Condições e níveis decodificados utilizados para as variáveis ensaiadas.

O planejamento experimental estatístico, ao contrário do univariado, determina que fatores e/ou variáveis possuem efeitos relevantes na resposta e, ainda, permite medir as interações entre os diferentes fatores e seus níveis. A matriz de experimentos gerada consta de 46 pontos de análise demonstrados no Quadro 2.

Corrida experimental	Temperatura	pH	Cobre	Manganês	Álcool veratril
1	35 (+1)	6,8 (0)	0,5 (0)	5 (+1)	1 (0)
2	35 (+1)	6,8 (0)	0,5 (0)	2,5 (0)	0 (-1)
3	28 (0)	6 (-1)	0,5 (0)	2,5 (0)	0 (-1)
4	28 (0)	6 (-1)	0 (-1)	2,5 (0)	1 (0)
5	28 (0)	6,8 (0)	1 (+1)	0 (-1)	1 (0)
6	28 (0)	6,8 (0)	0 (-1)	5 (+1)	1 (0)
7	21 (-1)	6,8 (0)	0,5 (0)	2,5 (0)	0 (-1)
8	28 (0)	6,8 (0)	0,5 (0)	2,5 (0)	1 (0)
9	35 (+1)	6,8 (0)	0,5 (0)	0 (-1)	1 (0)
10	28 (0)	6,8 (0)	0,5 (0)	5 (+1)	0 (-1)
11	28 (0)	6,8 (0)	0 (-1)	2,5 (0)	2 (+1)
12	28 (0)	6 (-1)	0,5 (0)	5 (+1)	1 (0)
13	28 (0)	6,8 (0)	0,5 (0)	2,5 (0)	1 (0)
14	35 (+1)	6 (-1)	0,5 (0)	2,5 (0)	1 (0)
15	21 (-1)	6,8 (0)	0 (-1)	2,5 (0)	1 (0)
16	28 (0)	6 (-1)	0,5 (0)	2,5 (0)	2 (+1)
17	28 (0)	6,8 (0)	1 (+1)	5 (+1)	1 (0)
18	28 (0)	6,8 (0)	0,5 (0)	2,5 (0)	1 (0)
19	28 (0)	6,8 (0)	0,5 (0)	2,5 (0)	1 (0)
20	21 (-1)	7,6 (+1)	0,5 (0)	2,5 (0)	1 (0)
21	21 (-1)	6,8 (0)	1 (+1)	2,5 (0)	1 (0)
22	28 (0)	6 (-1)	1 (+1)	2,5 (0)	1 (0)
23	28 (0)	6,8 (0)	0,5 (0)	2,5 (0)	1 (0)
24	28 (0)	6,8 (0)	0,5 (0)	2,5 (0)	1 (0)
25	28 (0)	6,8 (0)	0 (-1)	0 (-1)	1 (0)
26	21 (-1)	6 (-1)	0,5 (0)	2,5 (0)	1 (0)
27	35 (+1)	7,6 (+1)	0,5 (0)	2,5 (0)	1 (0)
28	28 (0)	7,6 (+1)	0,5 (0)	5 (+1)	1 (0)
29	21 (-1)	6,8 (0)	0,5 (0)	2,5 (0)	2 (+1)
30	21 (-1)	6,8 (0)	0,5 (0)	0 (-1)	1 (0)
31	28 (0)	7,6 (+1)	0,5 (0)	0 (-1)	1 (0)
32	28 (0)	6,8 (0)	1 (+1)	2,5 (0)	2 (+1)
33	28 (0)	6,8 (0)	0,5 (0)	0 (-1)	2 (+1)
34	21 (-1)	6,8 (0)	0,5 (0)	5 (+1)	1 (0)
35	28 (0)	6,8 (0)	1 (+1)	2,5 (0)	0 (-1)
36	28 (0)	7,6 (+1)	0,5 (0)	2,5 (0)	0 (-1)
37	28 (0)	6 (-1)	0,5 (0)	0 (-1)	1 (0)
38	28 (0)	7,6 (+1)	1 (+1)	2,5 (0)	1 (0)
39	28 (0)	6,8 (0)	0,5 (0)	5 (+1)	2 (+1)
40	28 (0)	7,6 (+1)	0,5 (0)	2,5 (0)	2 (+1)

Quadro 2 - Matriz do delineamento experimental de Box-Behnken com 3 níveis e 5 fatores. Os níveis estão representados através de códigos (-1; 0 e +1) e pelos valores decodificados. (continua)

Corrida experimental	Temperatura	pH	Cobre	Manganês	Álcool veratril
41	35 (+1)	6,8 (0)	0 (-1)	2,5 (0)	1 (0)
42	28 (0)	6,8 (0)	0,5 (0)	0 (-1)	0 (-1)
43	28 (0)	7,6 (+1)	0 (-1)	2,5 (0)	1 (0)
44	28 (0)	6,8 (0)	0 (-1)	2,5 (0)	0 (-1)
45	35 (+1)	6,8 (0)	0,5 (0)	2,5 (0)	2 (+1)
46	35 (+1)	6,8 (0)	1 (+1)	2,5 (0)	1 (0)

Quadro 2 - Matriz do delineamento experimental de Box-Behnken. Os níveis estão representados através de códigos (-1; 0 e +1) e pelos valores decodificados. (Conclusão)

Enzimas modificadoras de lignina (LMEs)

A atividade das principais enzimas ligninolíticas foi verificada através das metodologias descritas abaixo. O controle positivo utilizado foi uma linhagem de *Lentinus crinitus*, já descrita como produtora de lacase (Niebisch *et al.*, 2010).

Oxidases totais

A determinação da atividade de oxidases foi verificada pelo monitoramento da oxidação do ABTS, a 420 nm, em intervalos de 10 minutos durante 20 minutos, em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC, através da metodologia de Machado e Matheus (2006) modificada. A mistura de reação apresenta em 1 mL: 0,85 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; micélio fresco; 0,05 mL de H₂O₂ 2 mM, 0,1 mL de ABTS 5 mM e 50 µg de micélio. A reação teve início pela adição do ABTS. Uma unidade enzimática (UE) corresponde à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de substrato por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Lacase (Lac)

A atividade de Lac foi determinada pela oxidação de ABTS conforme descrito acima, porém na ausência de H_2O_2 . Uma unidade enzimática (UE) corresponde à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Peroxidases totais

A presença de peroxidases foi verificada com base nos valores de unidades de enzimas obtidos para oxidases totais com a subtração dos valores obtidos para lacase, pela seguinte fórmula:

$$\text{UE Peroxidases totais} = \text{UE oxidases totais} - \text{UE lacase}$$

Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata, tanto para amostras quanto para controles. Os dados obtidos foram analisados através do programa ASSISTAT Versão 7.5 beta – 2010 (<http://www.assistat.com>), pela análise de variância (teste ANOVA), seguido da aplicação do teste Tukey para a comparação das médias. Foram consideradas diferenças significativas entre as variáveis de cada tratamento quando $p < 0,01$.

Extração de DNA , PCR e Sequenciamento

Foram inoculados nove pontos de micélio em Placa de Petri com papel celofane esterilizado. Após três dias de crescimento, o micélio novo foi retirado com auxílio de uma espátula esterilizada. A extração de DNA foi realizada com o *UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit* da *MO BIO Laboratories, Inc.*

As condições das reações para amplificação das regiões ITS (V9G e ITS4) e EF (EF1-728F e EF-2) foram as descritas por Stringari (2009): 50 ng de

DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de *Taq* polimerase, 0,06 μ M de *primers* (3 pmol/reacção), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, e volume final de 50 μ L. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*® (Modelo: *Mastercycler Gradient*), com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72°C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72°C.

As condições da reacção de amplificação da região do gene de β -tubulina (Bt2a e Bt2b) foram as descritas por Glass e Donaldson (1995): 100 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,25U de *Taq* polimerase, 0,4 μ M de *primers* (3 pmol/reacção), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, e volume final de 25 μ L. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*® (Modelo: *Mastercycler Gradient*), com desnaturação inicial a 95° C por 3 minutos; 34 ciclos de 40 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguida de extensão final de 10 minutos a 72° C.

Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*®).

Os sequenciamentos das regiões ITS1, 5,8S, ITS2, EF1-728F, EF-2, Bt2a e Bt2b foram realizados pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger *et al.* (1977), utilizando a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes, em sequenciador Automático de DNA megaBACE. Para a reacção de sequenciamento foram utilizados cerca de 50ng da reacção de PCR purificada, 0,2 μ M dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação e 4 μ L de mistura para sequenciamento ET (Kit: *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da *Amersham Biosciences*), completando com água milli-Q para um volume final de 10 μ L.

A amplificação foi realizada em um termociclador *Eppendorf* (Modelo: *Mastercycler Gradient*), seguindo uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto; 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, 1 minuto e 5 segundos a 50°C, 4 minutos a 60°C, 20 min a 8°C.

Ao produto da reacção de sequenciamento realizado com produto de PCR purificado com acetato de amônio, foram adicionados 1 μ L de acetato de amônio ($AcNH_4$) 7,5M e 30 μ L de etanol 96%. Após a homogeneização por

inversão 30 vezes a placa foi centrifugada por 45 minutos a 2500 RCF a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa seguido de um *spin* a 500 RCF, com a placa invertida sobre papel toalha. O *pellet* foi lavado com 100 µL de etanol 70 % (recém preparado, não gelado). Seguindo-se uma nova centrifugação a 2500 RCF por 45 minutos, e o sobrenadante foi descartado por inversão da placa seguido de um *spin* a 750 RCF, com a placa invertida sobre papel toalha. Em seguida a placa ficou em estufa a 37°C durante 3 minutos. Após esse tratamento, cada amostra foi ressuspensa e tratada como nos itens anteriores. Todos os procedimentos, desde a reação de sequenciamento, foram realizados sob proteção de luz direta, cobrindo a placa com papel alumínio.

Análise das sequências

As sequências consenso foram obtidas com o auxílio do programa BIOEDIT (HALL, 1999), alinhadas e editadas pelo programa MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2009) e conferidas por inspeção visual. Após a obtenção da sequência consenso para cada isolado, estas foram analisadas pelo programa MUSCLE incubado no próprio MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2009). Para comparar e chegar ao nível de espécie os isolados de *Pestalotiopsis* buscou-se no *Genbank* sequências depositadas de regiões ITS, EF e β -tubulina.

Resultados e discussão

Inicialmente, foi avaliado o potencial de degradação de trinta e cinco isolados de fungos endofíticos pertencentes aos gêneros *Colletotrichum* (5 espécies), *Guignardia* (10 espécies), *Pestalotiopsis* (16 espécies) e *Phomopsis* (4 espécies). Os testes foram realizados em placas de Petri contendo meio de saís com corantes da família Remazol. Dos isolados testados apenas um pertencente ao gênero *Colletotrichum* (denominada A47) apresentou um pequeno halo de descoloração para o corante Remazol amarelo. Em relação ao corante Remazol vermelho não foram identificados isolados capazes de descolori-lo. Já o corante RB220 foi descorado por cinco isolados pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis*, denominados 48J, 14JA, 3HAI, 1IIG, BB1, destes, os isolados 48J e 14JA foram selecionados para os testes posteriores por apresentarem descoloração superior a 50% do diâmetro da placa (**Figura 1**).

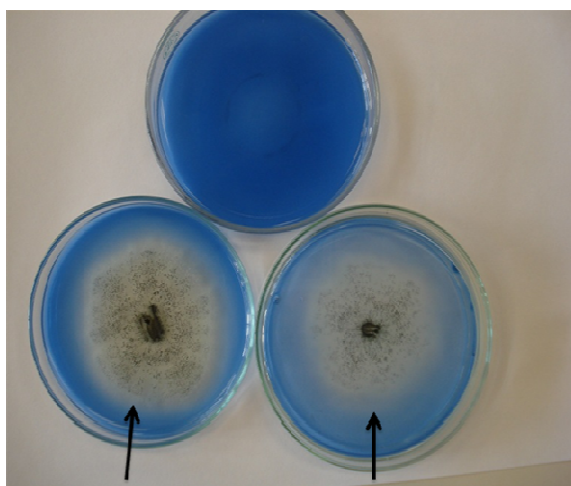


FIGURA 1: Área descorada após 10 dias do inóculo do isolado 14JA.

Fonte: o autor.

Descoloração em meio líquido

Para a análise das linhagens selecionadas quanto a descoloração em meio líquido foi primeiramente obtido o perfil de absorção de luz UV-Vis de uma solução aquosa do corante RB220 a 0,1 g/L. Pode-se observar a presença de dois picos de absorção, um a 280 nm e outro a 600 nm, que correspondem a absorbância de anéis aromáticos e ligações azo respectivamente. Em seguida, foi avaliado o potencial de descoloração em meio líquido para as linhagens de

Pestalotiopsis 14JA e 48J. Após 15 dias de incubação em meio de sais líquido contendo 0,1g/L de corante os sobrenadantes foram novamente submetidos à análise de varredura UV-vis. A figura 2 demonstra a descoloração realizada pela linhagem 14JA. As duas linhagens apresentaram um bom potencial de degradação tanto a 280 quanto a 600 nm, representado pela queda nos picos de absorbância (**Figura 3**). Quando considerado o pico de absorção na região visível, 600 nm pode-se observar uma descoloração em cultura de aproximadamente 95% e 85% para *Pestalotiopsis* 14JA e 48J, respectivamente. Segundo Knapp *et al.* (1995), quando ocorre degradação pode-se observar remoção completa do principal pico de luz visível ou mudanças significativas no espectro de absorbância. O que sugere que os resultados obtidos podem indicar biodegradação do corante RB220.



Figura 2: Solução de RB220 (0,1 g/L) antes e após incubação por 15 dias com a linhagem 14JA.

Fonte: o autor.

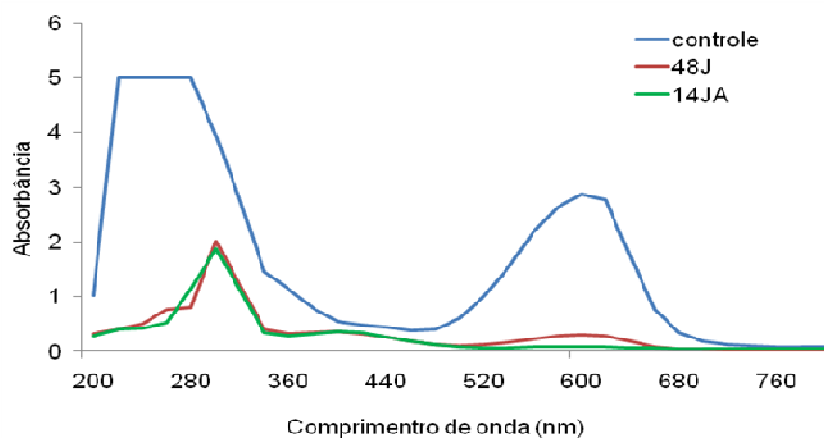


Figura 3: Espectro de absorção da solução de RB220 0,1 g/L antes e após incubação com as linhagens 14JA e 48J

Fonte: o autor.

Seleção das melhores fontes de carbono

A seleção das melhores fontes de carbono e nitrogênio a serem utilizados no meio de cultivo foi feita pela avaliação tanto pela descoloração em cultura, bem como pela atividade descorante realizada pelo sobrenadante e micélio. Tendo como base o crescimento do micélio, foi possível verificar que não há padrão definido entre as diversas fontes de carbono, bem como de uma mesma fonte em diferentes concentrações. Com relação à descoloração em cultura de 48J (**Figura 4**), nota-se uma alta porcentagem de descoloração em todos os meios testados entre 71 e 94% com exceção de galactose, nas maiores concentrações testadas, onde foi observada uma redução significativa para 52 e 37%, respectivamente na porcentagem de descoloração. Em decorrência do perfil observado para galactose, uma relação inversa entre concentração e atividade descorante, os testes foram refeitos com concentrações menores desta fonte (**Figura 5**). Com base nos resultados obtidos pode-se observar que dentre as concentrações testadas a melhor corresponde a 1 g/L deste açúcar, com cerca de 84% de descoloração, e em concentrações superiores ou inferiores ocorre perda de atividade descorante.

Os dados relacionados à linhagem 14JA demonstram um perfil de descoloração em cultura distinto tanto para as diversas fontes de carbono quanto para uma mesma fonte em diferentes concentrações (**Figura 6**). Sendo que os melhores resultados são na presença de galactose, independente da concentração testada. Para avaliar se concentrações menores de galactose teriam efeito estimulante da descoloração em cultura, os testes foram refeitos com concentrações menores de galactose (**Figura 7**). Os resultados indicam um pico máximo de descoloração, cerca de 80%, na concentração de 5 g/L, sendo que em concentrações superiores e inferiores a galactose pode reprimir a capacidade desta linhagem na degradação, da mesma maneira que observado para a linhagem 48J. Em ambos os casos pode-se observar que o crescimento do micélio não está diretamente atrelado à descoloração em cultura obtida. Além de que a linhagem 48J apresenta menor variação no

crescimento micelial, com diferentes fontes de carbono, quando comparada a linhagem 14JA.

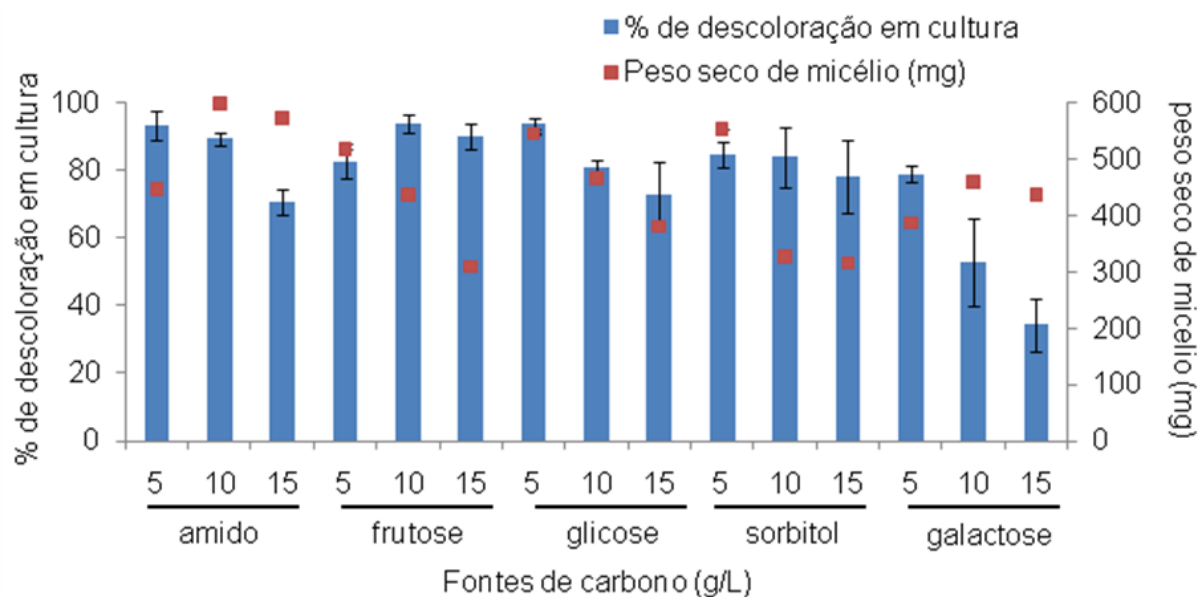


Figura 4 – Efeito da suplementação de fonte de carbono sobre a descoloração em cultura e crescimento micelial de **48J**. Valores obtidos a 600 nm, após 15 dias de cultivo.

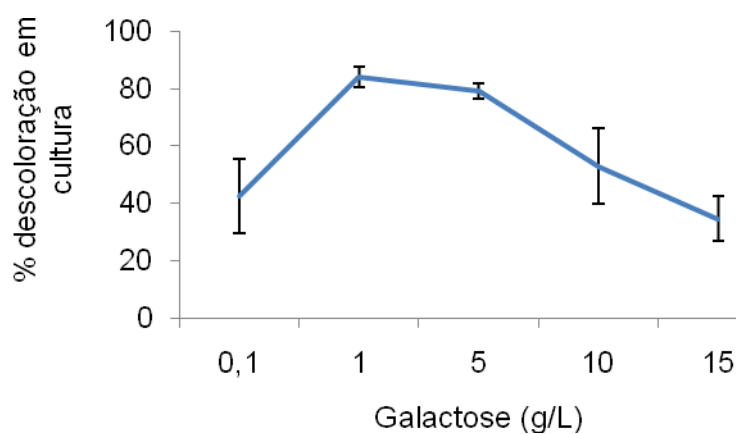


Figura 5 – Efeito de variadas concentrações de galactose sobre a descoloração em cultura de **48J**. Valores obtidos a 600 nm, após 15 dias de cultivo.

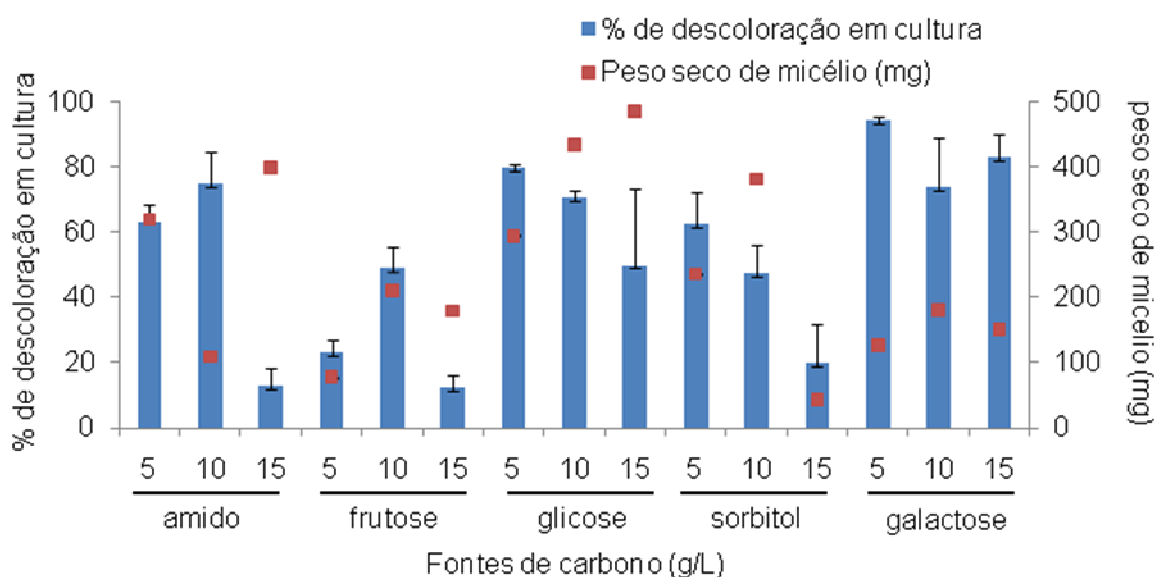


Figura 6 – Efeito da suplementação de fontes de carbono sobre a descoloração em cultura e crescimento micelial de **14JA**. Valores obtidos a 600 nm, após 15 dias de cultivo.

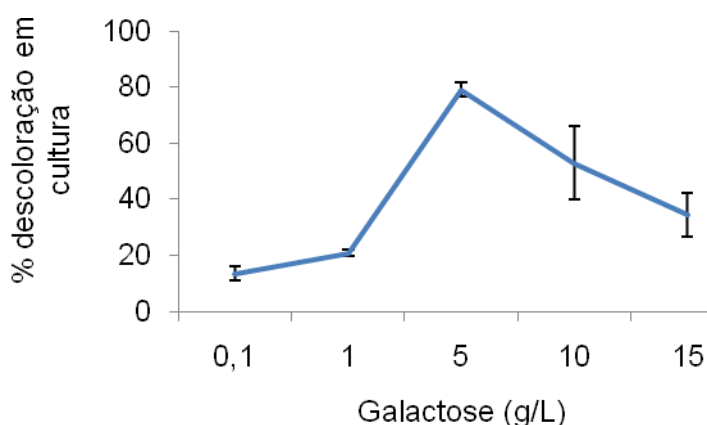


Figura 7 – Efeito de variadas concentrações de galactose sobre a descoloração em cultura de **14JA**. Valores obtidos a 600 nm, após 15 dias de cultivo.

Avaliação do potencial de descoloração após 90 minutos e após 24 horas

Tendo em vista que os resultados demonstrados acima são resultantes de 15 dias de incubação, tempo elevado no que diz respeito à remoção de corantes em efluentes, foi realizado um novo teste com o sobrenadante e micélio das culturas. Este corresponde à atividade descorante, em um intervalo de 90 min. Para ambas as linhagens os resultados de atividade descorante do sobrenadante não apresentaram resultados positivos (dados não mostrados). Já com relação à atividade descorante realizada pelo micélio observou-se

descoloração, mas em porcentagens relativamente baixas. Embora já tenha sido descrito que as enzimas ligninolíticas normalmente são secretadas (WESENBERG *et al.*, 2003; CAVALLAZZI *et al.*, 2004), também existem relatos que as enzimas envolvidas neste processo possam estar associadas à biomoléculas intracelulares (YESILADA *et al.*, 2002; SVOBODAVÁ *et al.*, 2008). Para avaliar qual a fração (sobrenadante ou micélio) responsável pela descoloração obtida em cultura a atividade descorante realizada pelo micélio e pelo sobrenadante foram novamente medidas, porém o tempo de análise foi estendido para 24 horas. Para este teste foram selecionados dois meios de cultivo, um para cada linhagem, sendo meio de saís na presença de galactose 5 g/L para 14JA e galactose 1 g/L para o fungo 48J.

Novamente, o sobrenadante de ambas as culturas fúngicas não exerceu atividade descorante sobre o substrato neste período (dados não mostrados). Porém, com o aumento do período de incubação foi observada atividade descorante relacionada ao micélio em torno de 60% para os dois fungos (**Figura 8**). O processo de descoloração realizado pelo micélio pode ser decorrente tanto de atividade enzimática quanto de adsorção do substrato. Já existem relatos do processo de adsorção realizado no corante *Reactive Blue Brilliant* (RBBR) em solução aquosa por biomassa das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomuces pombe*, *Kluyvermyces marxianus*, *Candida* sp., dentre outras (AKSU; DÖNMEZ, 2003).

Origem da atividade descorante

A seguir foi avaliada se a atividade descorante era decorrente de ação enzimática. Para este propósito o teste foi refeito após inativação das enzimas presentes no micélio através de autoclavagem, os resultados demonstram que a atividade obtida foi totalmente inibida com este procedimento, o que indica que a atividade descorante é decorrente de ação enzimática. Alternativamente foi avaliada a atividade descorante do micélio fresco na presença de azida de sódio, um conhecido inibidor de lacases (**Figura 8**). Pode-se notar uma inibição total desta atividade o que indica a presença de uma enzima degradante do corante RB220.

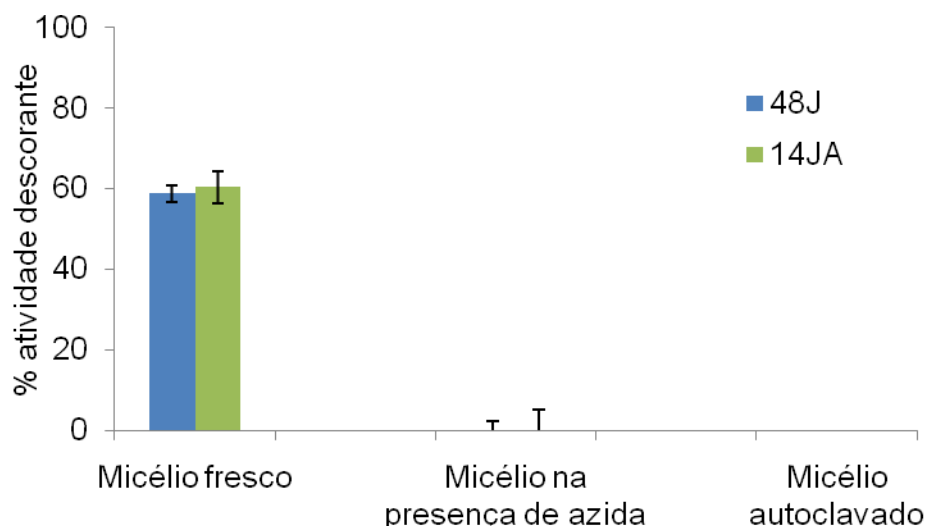


Figura 8 – Atividade descorante realizada pelo micélio ao corante RB220 em diferentes condições, após 24 h de incubação. Valores obtidos a 600 nm.

Seleção das melhores fontes de nitrogênio

Tendo como base que a atividade descorante é realizada por biomolécula intracelular via ação enzimática, e que a produção deste é dependente de vários fatores além de fontes de carbono. Em seguida, foi avaliado o efeito de distintas fontes de nitrogênio sobre a produção da atividade descorante. Pode-se observar, para a linhagem 48J (**Figura 9**), o meio onde foi obtido o melhor crescimento (9 mg biomassa seca), tartarato de amônio 10 g/L, sendo que a presença concentrações distintas e das demais fontes de nitrogênio o crescimento foi inibido. Porém, a maior descoloração em cultura foi obtida em meio distinto, contendo tartarato de amônia 5 g/L, cerca de 70%. Da mesma forma esta foi a melhor fonte de nitrogênio observada quando avaliada a atividade descorante realizada pelo micélio após 24 horas de incubação, embora o percentual de redução de cor tenha chegado a um máximo de 35% (**Figura 10**).

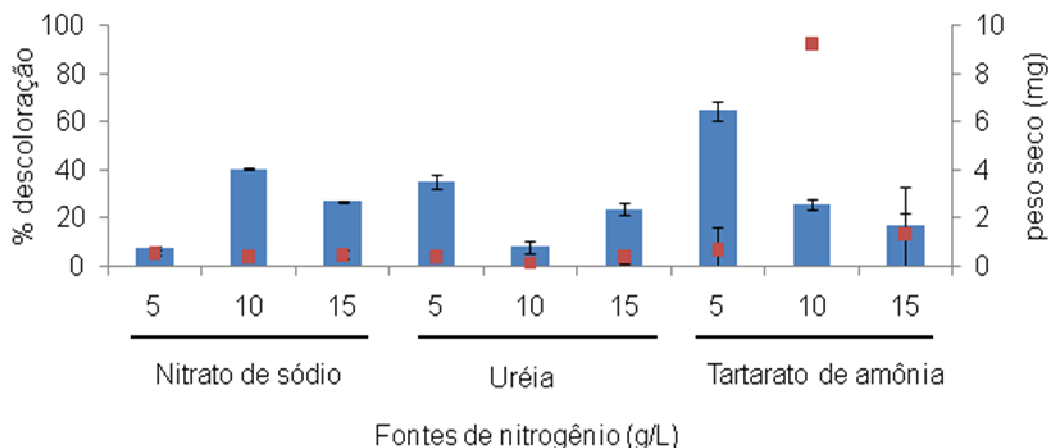


Figura 9 – Efeito de variadas fontes de nitrogênio sobre a descoloração de RB 220 em cultura e crescimento micelial de 48J. Valores obtidos a 600 nm, após 15 dias de cultivo em meio de sais contendo galactose 1 g/L como fonte de carbono.

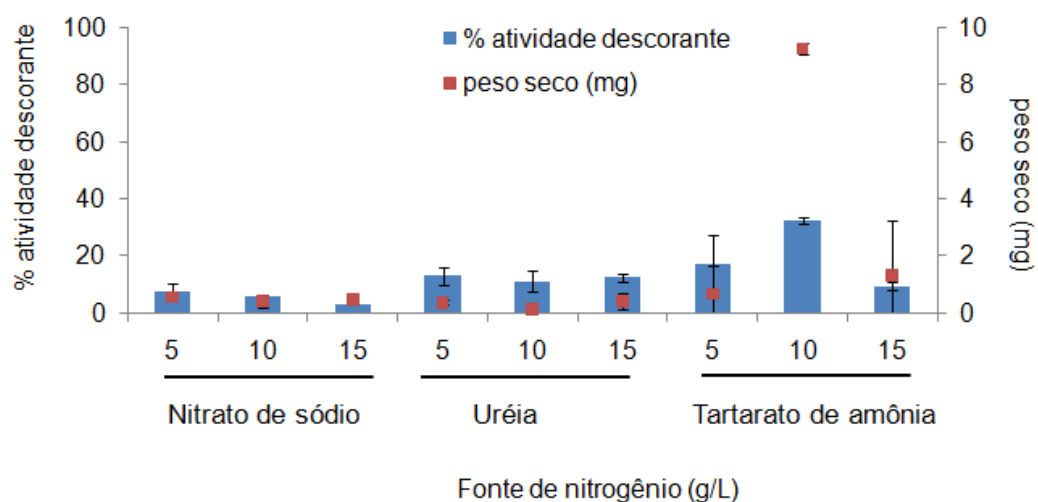


Figura 10 – Efeito de variadas fontes de nitrogênio sobre a atividade descorante realizada pelo micélio de 48J. Valores obtidos a 600 nm, após 24 horas de incubação em meio de sais contendo 0,1 g/L de RB220.

Com relação ao crescimento de 14JA em diferentes fontes de nitrogênio, observa-se novamente a falta de correlação direta quando comparado a concentração de fonte utilizada com a porcentagem de descoloração. De outro lado podemos observar que a porcentagem de descoloração em cultura aumenta proporcionalmente ao acréscimo de nitrogênio no meio de cultura e independentemente da fonte usada. Esta chegou a um pico de 91% na presença de uréia a 15 g/L (**Figura 11**), de maneira similar a obtida nos testes de atividade descorante realizada pelo micélio após 24 horas de incubação,

onde esta chegou a um pico de 40% de redução de cor, sendo esta a escolhida para dar sequência aos experimentos (**Figura 12**).

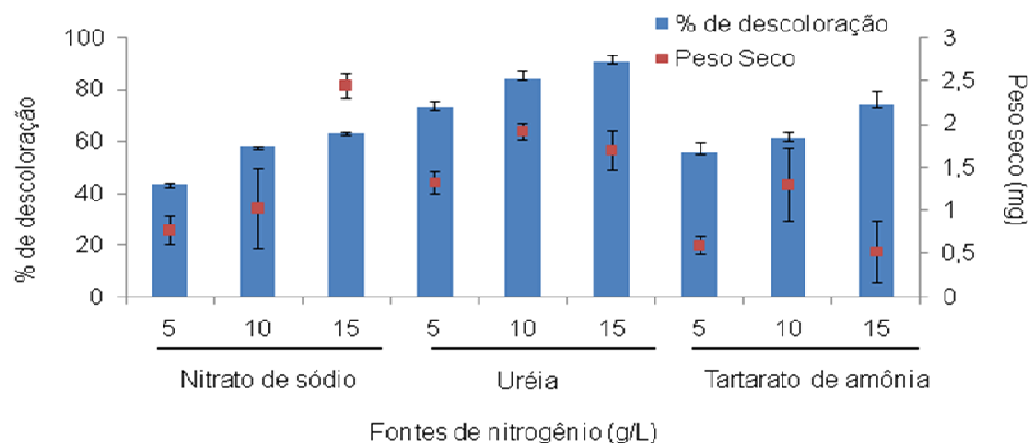
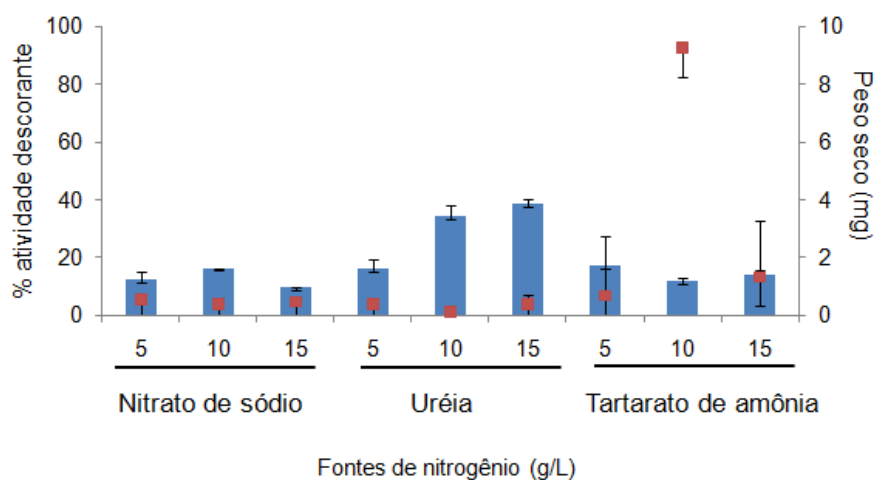


Figura 11 – Efeito de variadas fontes de nitrogênio sobre a descoloração em cultura e crescimento micelial da linhagem 14JA. Valores obtidos a 600 nm, após 15 dias de cultivo em meio de sais contendo galactose 5 g/L como fonte de



carbono.

Figura 12 – Efeito de variadas fontes de nitrogênio sobre a atividade descorante realizada pelo micélio de 14JA. Valores obtidos a 600 nm, após 24 horas de incubação em meio de sais contendo 0,1 g/L de RB220.

Seleção das melhores condições químicas e físicas de cultura por superfície de resposta

Na sequência foi avaliado, através de planejamento experimental fatorial, o efeito de cinco variáveis sobre a produção de atividade descorante do micélio, sendo elas temperatura, pH, suplementação de cobre e manganês além do efeito do indutor de produção enzimática, álcool veratril. O planejamento experimental fatorial é uma ferramenta estatística usada para se obter as melhores condições operacionais de um sistema sob estudo com um número menor de experimentos quando comparado com o método univariado de otimização de processo ("um fator por vez"). Para a linhagem 14JA a ferramenta de análise de superfície de resposta gerou como melhor modelo o processo chamado 2FI. Os resultados dos testes estatísticos estão demonstrados na tabela 1.

Tabela1 – Resultados obtidos nos testes de análise de variância para a linhagem 14JA

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Valor F	Valor p
Modelo	943,24	5	2,56	0.04 *
B-pH	1,67	1	0,02	0.88
C-Cobre	1,25	1	0,01	0.89
D-Manganês	16,38	1	0,22	0.63
BC	562,71	1	7,64	0.00
CD	361,21	1	4,90	0.03
Erro experimental:	2945,35	40		
Falta de ajuste	2185,58	35	0,41	0.94
Erro puro	759,76	5		

. * Significativo

Neste modelo um valor F de 2,56 implica em um modelo significativo, o que indica que pode ser utilizado para a análise dos dados. Existe cerca de 4,21% de possibilidade de que o calculado para o valor p seja decorrente de ruído, e valores inferiores a 0,05 indicam que o modelo é aplicável aos dados. Neste caso, a interpolação dos valores de pH e cobre (BC) e de cobre e

manganês (CD), exercem maior influência sobre os resultados de atividade decolorante, indicando que os três fatores que apresentam maior influência são cobre, manganês e pH. Além disso, o erro experimental falta de ajuste foi de 0,41 (Valor F) não é significativo quando comparado ao erro puro, novamente indicando a aplicação deste modelo nos dados avaliados. Como o fator temperatura não exerce efeito significativo com relação a esta análise, e tendo como base os resultados obtidos para a descoloração a temperatura ótima foi de 28 °C, inicialmente foi plotado um gráfico do efeito do pH e cobre na atividade decolorante (**Figura 13**). E nota-se que em pH elevado (7,6) é obtida melhor atividade decolorante na presença de 1 mM de cobre, assim como em pH baixo (6,0) apresenta-se melhor atividade na ausência do íon. Os parâmetros selecionados para a sequência das análises foi pH 7,6 na presença de 1 mM de cobre.

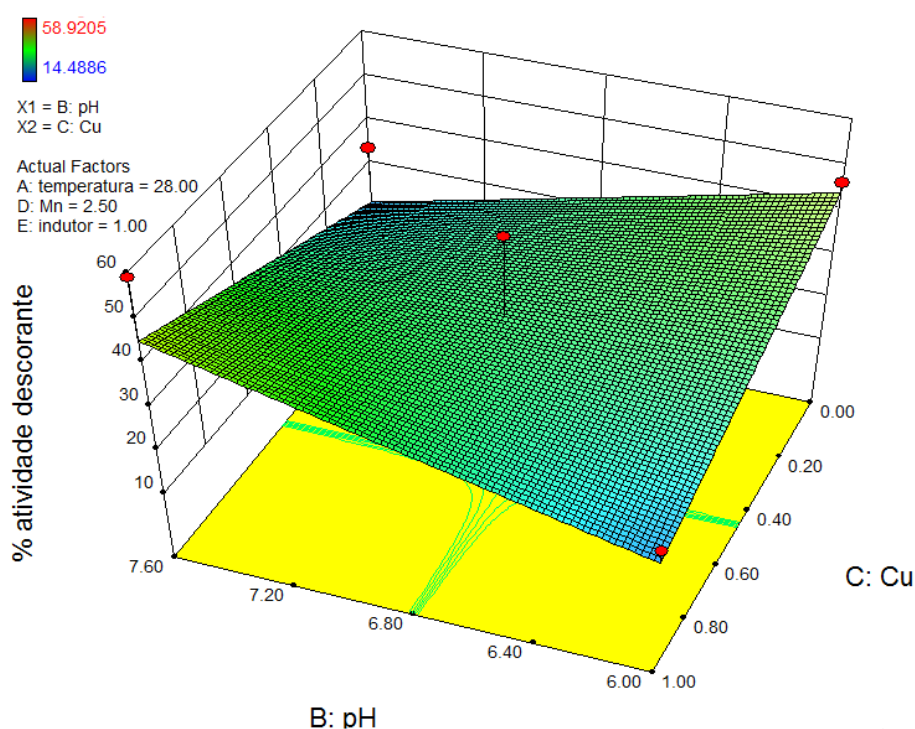


Figura 13 – Efeito do pH e das concentrações de cobre na atividade decolorante de 14JA, tendo como parâmetros fixos 28 °C, 2,5 mM de cobre e 1mM de indutor. Valores de atividade decolorante obtidos após 24 horas de incubação do micélio com solução de RB220 0,1 g/L.

O próximo passo foi a plotagem dos parâmetros ainda não analisados (manganês e indutor), com os demais parâmetros definidos acima como

valores fixos. Os resultados estão demonstrados na figura 14, e indicam que a melhor atividade descorante obtida foi na presença de 5 mM de manganês, na ausência de indutor.

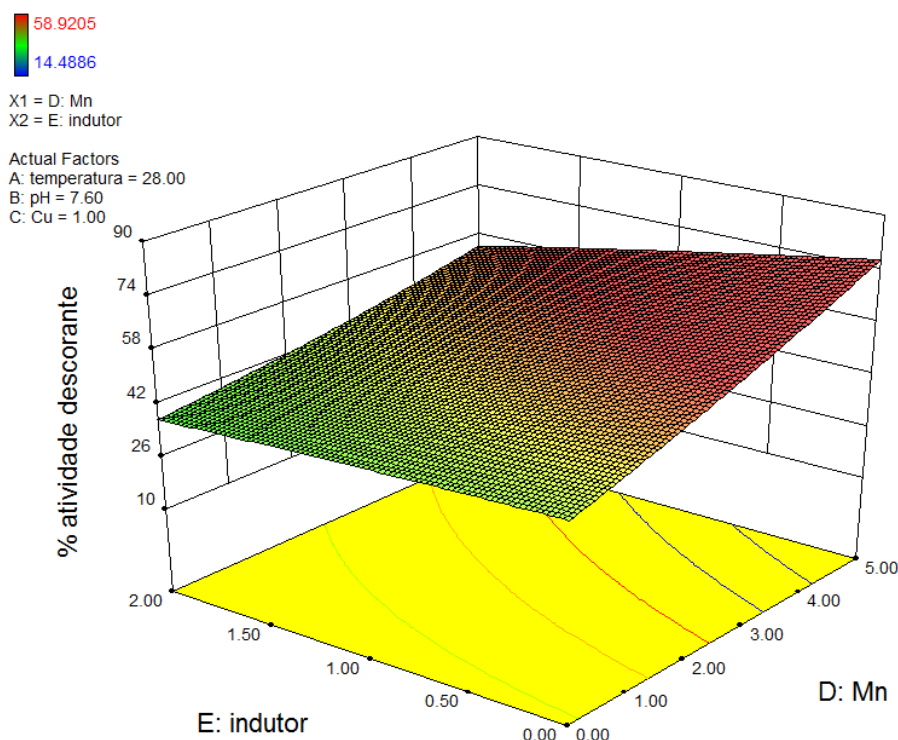


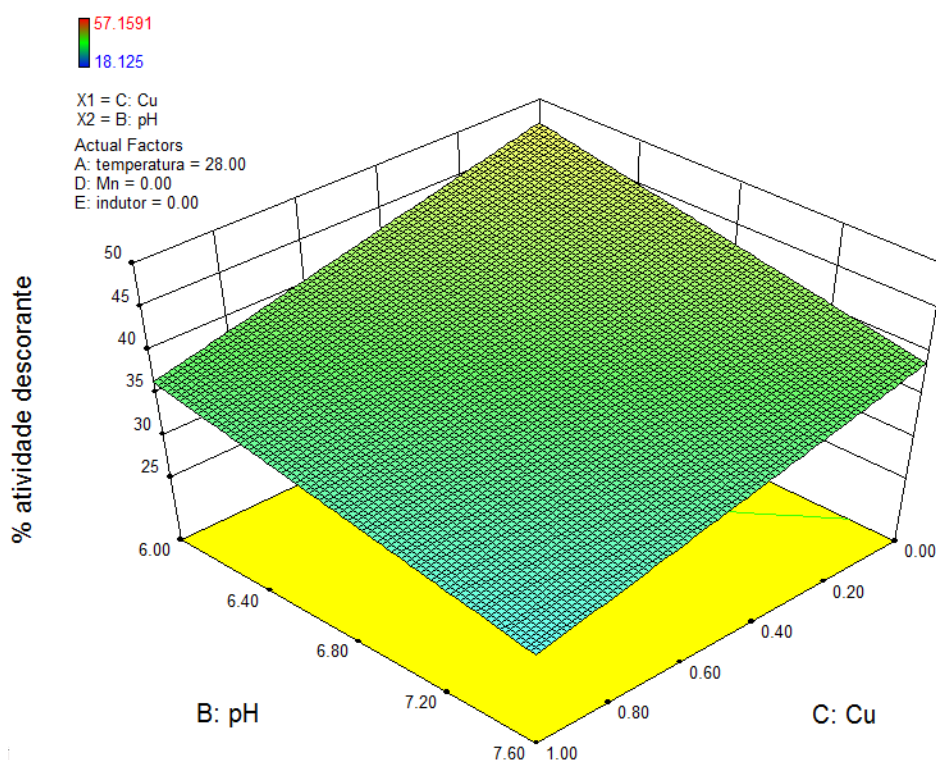
Figura 14 – Efeito do indutor e manganês na atividade descorante de 14JA, tendo como parâmetros fixos 28 °C, pH 7,6 e 1 mM de cobre. Valores de atividade descorante obtidos após 24 horas de incubação do micélio com solução de RB220 0,1 g/L.

Com relação aos experimentos realizados com a linhagem 48J o modelo linear foi selecionado e gerou como resultados das análises estatísticas a tabela 2. Neste modelo um valor F de 5,6 implica em um modelo significativo, o que indica que pode ser utilizado para a análise dos dados. Existe cerca de 4,43% de possibilidade de que o calculado para o valor p seja decorrente de ruído, e valores inferiores a 0,05 indicam que o modelo é aplicável aos dados. De maneira distinta ao obtido para a linhagem 14JA apenas os fatores pH e cobre exercem efeito significativo na produção da atividade descorante, sendo que os demais efeitos testados não influenciam a resposta estes foram determinados como fixos para a plotagem dos resultados (**Figura 15**). Pode-se observar que os melhores resultados são obtidos em pH 6 e na ausência de cobre. Os demais parâmetros foram definidos como temperatura 28 °C, na ausência de manganês e indutor.

Tabela 2 – Resultados obtidos nos testes de análise de variância para a linhagem 48J.

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Valor F	Valor p
Modelo	952,21	2	5,604229	0.0069 *
B-pH	375,94	1	4,425183	0.0413
C-Cobre	576,27	1	6,783274	0.0126
Erro experimental:	3653,06	43		
Falta de resíduo (Lack of Fit)	3291,30	38	1,197085	0.4671
Erro puro	361,77	5		

*significativo

**Figura 15** – Efeito do pH e cobre na atividade descorante de 48J, tendo como parâmetros fixos 28 °C, na ausência de manganês e indutor. Valores de atividade descorante obtidos após 24 horas de incubação do micélio com solução de RB220 0,1 g/L.

Após a otimização dos meios de cultivo foi selecionado um meio de cultivo para cada linhagem, descritos no quadro 4. A seguir, foi investigada a presença de enzimas ligninolíticas nos micélios das culturas através da oxidação do ABTS, substrato tanto de peroxidases quanto fenoloxidas.

	Linhagem	
	14JA	48J
Fonte de carbono	Galactose 5 g/L	Galactose 1 g/L
Fonte de nitrogênio	Uréia 15g/L	Tartarato de amônia 15g/L
Temperatura	28 °C	28 °C
pH	7,6	6
Suplementação com cobre	1 mM	--
Suplementação com manganês	5 mM	--
Suplementação com álcool veratril	--	--

Quadro 4 – Resumo dos dados obtido na otimização de meio de cultivo.

Os dados relativos à oxidação total do ABTS (**Figura 16**) indicam que as linhagens 14JA e 48J são capazes de produzir oxidases, a oxidação do substrato é alta nos primeiros 10 min de exposição ao micélio, sendo em torno de 2,03 unidades de enzima (UE) para a linhagem 48J e 2,18 UE para a linhagem 14JA. Após este período pode-se observar um pequeno aumento na oxidação do substrato, este não significativo.

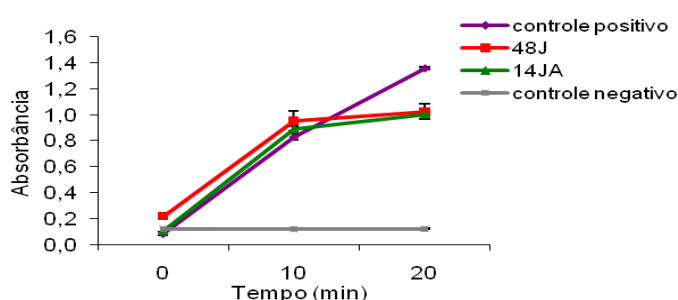


Figura 16 – Verificação da presença de oxidases totais nos micélios dos isolados 14JA e 48J, nos meios de cultivo otimizados. Valores obtidos através de análise a 600 nm.

Já com relação aos dados obtidos para a presença da enzima lacase pode-se observar um padrão similar ao obtido para oxidases totais (**Figura 17**). Apresentando apenas uma pequena variação dos valores de unidade de enzima obtidos, sendo 2,59 e 2,0 UE para 48J e 14JA, respectivamente.

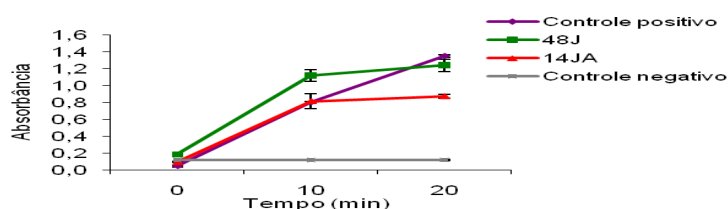


Figura 17 – Verificação da presença de lacase totais nos micélios das linhagens 14JA e 48J, nos meios de cultivo otimizados. Valores obtidos através de análise a 600 nm.

Os resultados indicam para as linhagens com relação à produção de lacases corroboram com relatos na literatura que demonstram a produção destas enzimas por fungos pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis*. A habilidade de *Pestalotiopsis guepinii* de descolorir corantes têxteis e de *Pestalotiopsis* sp. produzir e secretar lacase para degradação de ligninocelulose já tem sido descrita (HAO *et al.*, 2006; HAO *et al.*, 2007; SAPARRAT; HAMMER, 2006).

Com os dados obtidos pode-se inferir que no micélio da linhagem 14JA, das 2,18 UE encontradas apenas 0,18 UE corresponde à presença de peroxidases. Em decorrência da pequena participação destas enzimas não foram realizados testes específicos para a identificação destas. Já no micélio de 48J, todas as oxidases encontradas são lacases. Nota-se também que a presença de H_2O_2 no meio reacional de oxidases totais acarreta uma redução da oxidação do substrato (em torno de 0,56 UE).

Análise e sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal, EF1-728F- EF-2 da região $\alpha 1$ do fator de elongação e Bt2a e Bt2b do gene da β -tubulina, dos cinco isolados de *Pestalotiopsis* para identificá-los ao nível de espécie. Após o sequenciamento destas regiões foram obtidas sequências com: 602 a 638 pares de base (pb) para ITS, 411 a 449 pb para EF e 370 a 413 pb para β -tubulina. Essas sequências foram comparadas com as depositadas no *Genbank*, para este gênero.

O isolado 48J apresentou identidade genética de 100% com *Pestalotiopsis vismae* para a região ITS, 96% com *P. glandicola*, *P. longisetai* e *P. japonica* para a região sequenciada do gene EF e para a região do gene da β -tubulina 99% com *P. cocculi*, *P.sinensis*, *P.negleta*, *P.osyridis* e *P. microspora*. O isolado 14JA apresentou identidade genética de 97% com *Pestalotiopsis mangiferae* para a região ITS, 96% com *P. glandicola*, *P. longiseta* para a região EF e para o gene da β -tubulina 98% com *P. acaciae*, *P.gracilis*, e *P.palmarum*. O isolado BB1 apresentou identidade genética de 98% com *Pestalotiopsis mangiferae* para a região ITS, 98% com *P. glandicola* para a região EF e para o gene da β -tubulina 99% com *P. acaciae*. O isolado 3HAI apresentou identidade genética de 99% com *Pestalotiopsis mangiferae* para a região ITS, 98% com *P. glandicola* para a região EF e para o gene da β -tubulina 97%com *P. acaciae*, *P.gracilis*. O isolado 1IIG apresentou identidade genética de 99% com *Pestalotiopsis mangiferae* para a região ITS, 98% com *P. glandicola* para a região EF, e para o gene da β -tubulina 99%com *P. cruenta*, *P.gracilis*, *P.palmarum*, *P.aquatica* dentre outras. Esses resultados corroboram com os trabalhos de Jeewon (2002) que diz que muitas espécies de *Pestalotiopsis* levam seu nome atrelado ao de seu hospedeiro, pois muitos supõem que esses fungos são específicos de apenas um hospedeiro, fazendo com que ocorra uma confusão com a nomenclatura deste grupo. Liu *et al.*(2010) comentam sobre as controvérsias taxonômicas do gênero e após comparação de dados morfológicos com sequenciamento, verificaram que a característica coloração dos conídios é coincidente com os resultados de sequenciamento porém outras características morfológicas são conflitantes com dados moleculares. Os autores também sugerem um aprofundamento nos

estudos taxonômicos deste gênero. Existe ainda uma grande dificuldade em se trabalhar com as sequências de EF, pois são muito escassas pra esse gênero no *Genbank*.

Com o resultado do sequenciamento dos fragmentos dos genes ITS (**Figura 18, 19, 20**), EF (**Figura 21, 22, 23**) e Beta Tubulina (**Figura 24, 25, 26**), foram construídas árvores filogenéticas utilizando três análises diferentes para cada fragmento, Bayesiana, Verossimilhança e Máxima Parcimônia. As sequencias dos *Pestalotiopsis* desse estudo e algumas da coleção do LabGeM foram comparadas com sequencias depositadas no GenBank para descobrir suas relações.

Quando analisada a região ITS os isolados 14JA e 48J ficam mais distantes com a análise Bayesiana e relativamente próxima quando utilizadas Verossimilhança e Máxima Parcimônia.

Para a região EF o isolado 14 JÁ é mais próximo do isolado da coleção 11AI em todas as análises. Para essa região não foi analisado 48J pois a sequencia foi perdida.

A análise de β -tubulina nos mostra uma grande semelhança de 48J com a sequencia depositada no GenBank de *Pestalotiopsis sinensis* (HM573292) para todas as análises. E para o 14JA nas três análises ela demonstra um comportamento semelhante agrupando proximamente ao isolado da coleção do LabGeM BB1.

Com base nesses resultados não se pode concluir a que espécie de *Pestalotiopsis* os isolados pertencem. Segundo Tejesvi *et al.* (2009), a identificação do gênero *Pestalotiopsis* é mais confiável quando abordagem clássica e molecular são combinados. Assim precisa-se de uma abordagem molecular e morfológica para a real identificação da espécie.

Liu *et al.* (2010) sugere que as regiões ITS são menos informativas do que a do gene Tub-2 para resolver as relações taxonômicas de *Pestalotiopsis*.

Jeewon, Liew e Hyde (2004) relatam um grande problema na nomenclatura do gênero e sugerem uma grande revisão taxonômica do grupo.

Conclusão

Com esse trabalho foi possível concluir que fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis* têm potencial para degradar o corante de indústria têxtil Remazol azul. A enzima que os fungos estudados utilizam para descolorir é a Lacase e esta está ligada à parede do micélio. A busca pela melhor condição de cultura através da superfície de resposta é um ótimo meio por proporcionar um ganho na realização dos experimentos e economia em material. O isolado 48J pertence à espécie *Pestalotiopsis vismae*. Os isolados 14JA, 3HAI, 1IIG e BB1 provavelmente pertencem à espécie *Pestalotiopsis mangiferae* pelos dados do sequenciamento da região ITS. O gênero *Pestalotiopsis* precisa de uma profunda revisão taxonômica, na qual dados morfológicos e moleculares sejam associados para servirem como base para uma confiável identificação taxonômica deste gênero.

Perspectivas futuras

Avaliar a toxicidade do produto descorado com testes mutagênicos, aumentar a produtividade da produção de lacase através de melhoramento genético e associar características morfológicas a dados de sequenciamento para melhorar a identificação de isolados deste gênero tão promissor, em nível de espécie.

Referências

AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. **Chemosphere**, v. 50, p. 1075-1083, 2003.

ASGHER, M. ; BHATTI, H.N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R.L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system, **Biodegradation** 19 p. 771–783 (2008).

CAVALLAZZI, J. R. P.; OLIVEIRA, M. G. A.; KASUYA, M. C. M. Laccase production by *Lepista sordida*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 261-263, 2004.

CAZETTA, M.L. *et al.* Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresour. Technol.** 98, p. 2824–2828, 2007.

DAFALE, N., RAO, N.N., MESHAM, S.U., WATE, S.R. Decolorization of azo dyes and simulated dye bath wastewater using acclimatized microbial consortium biostimulation and halo tolerance. **Bioresour. Technol.** 99, p.2552–2558, 2008.

GHANEM, N.B. *et al.* Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid state cultures: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Bioresour. Technol.** 73, p.113–121, 2000.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98.

HAO *et al.* Involvement of lignocellulolytic enzymes in the decomposition of a leaf litter in a subtropical forest. **J Eukaryot. Microbiol.** 53, p. 193-198, 2006.

HAO *et al.* Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye **J Ind Microbiol Biotechnol** 34 p.233–240, 2007.

JEEWON, R., LIEW, E.C.Y. and HYDE K.D. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. **Fungal Diversity** 17 p.39-55, 2004.

KNAPP, J. S.; NEWBY, P. S. E REECE, L. P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 664-668, 1995.

LIU *et al.* Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57 p. 528-535, 2010.

MEYER, U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: BROWN, A. W. A. **Ecology of Pesticides**. New York: John Wiley, 1978.

NIEBISCH C. H., *et al.*, Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract, **J. Hazard. Mater.**, 2010.

RAFII, F., FRANKLIN, W., CERNIGLIA, C.E. AZO reductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. **Appl. Environ. Microbiol.** 56, p.2146–2151, 1990.

RAO, N.N., GAURAY, B., PRADNYA, K., KAUL, S.N. Fenton and Electro-Fenton methods for oxidation of H-acid and Reactive Black 5. **J. Environ. Eng.** 132, p.367–376, 2006.

REN, S., GUO, J., ZENG, G., SUN, G. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72, p.1316–1321, 2006.

SETHILKUMAR, S.R. *et al.* Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. **Bioresour. Technol.** 96, p.1380–1386, 2005.

SVOBODOVÁ, K.; MAJCHERCZYK, A.; NOVOTNÝ, Č; KÜES, U. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 463–471, 2008.

SWOFFORD DL. 2003. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Version 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Assoc.

VAN DER ZEE, F.P., VILLAVERDE, S. Combined anaerobic–aerobic treatment of azo dyes – a short review of bioreactor studies. **Water Res.** 39, p.1425–1440, 2005.

YESILADA, G.; CING, S.; ASMA, D. Decolourization of textile dye Astrazon Red FBL by *Funallia troglia* pellets. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 155-157, 2002.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances** v. 22, p. 161-187, 2003.

APÊNDICE 1

METODOLOGIA DETALHADA E EXPERIMENTOS ADICIONAIS

Este projeto de pesquisa foi realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM), Laboratório de Biodegradação (Departamento Ciências - Bioquímica) e na Unidade de Sequenciamento e Análise de DNA (SEAD) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Os fungos utilizados neste trabalho e pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis* foram:

- 14JA e 48 J fungos depositados na Coleção de Fungos do LabGeM (UFPR).
- Outros fungos utilizados no seqüenciamento foram: 1IA1; 1IIG; 1SD1; 1SF1; 2IF; 3HAI e BB1 todos depositados na Coleção de Fungos do LabGeM (UFPR).

Meios de Cultura e Soluções Utilizadas

Meio de Sais Líquido

KH ₂ PO ₄	1,5 g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,02 g
ZnSO ₄	0.02 g
Água destilada	Para 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N.

Para Meio de Sais Sólido utilizado para crescimento de colônia em placa foi adicionado 6,0 g de NaNO_3 e 1,5% de ágar.

Para Meio de Sais Colorido foram adicionadas 0,1 g de corante por litro de meio.

Meio Completo (MC) (PONTECORVO *et al.*, 1953 modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

NaNO_3	6,0 g
KH_2PO_4	1,5 g
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
FeSO_4	0,02 g
ZnSO_4	0.02 g
Glicose	10,0 g
Extrato de Levedura	2,0 g
Peptona	2,0 g
Caseína Hidrolisada	1,5 g
Solução de Vitaminas	1,0 mL
Água destilada	Para 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N.

Para MC sólido foi acrescentado 1,5% de ágar.

Meio BDA

Batata descascadas e cortadas	200g
Dextrose	20g
Água destilada	Para 1000 mL

A batata foi fervida em água destilada por quinze minutos, depois de peneirado, foi adicionada ao caldo a dextrose e o volume foi completado para

1000 mL. Após o pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N e foi adicionado 1,5% de ágar.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave por 20 minutos em pressão de 1 atm, a 121°C e estocada em temperatura ambiente.

Solução de Vitaminas

Ácido Nicotínico	100,0 mg
Ácido <i>p</i> -Aminobenzóico	0,2 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
H ₂ O destilada esterilizada	para 100 mL

A solução foi aquecida em banho Maria a 98°C por 15 minutos e guardada em frasco escuro, previamente autoclavado, a 4°C.

Tampão TBE 1x (solução estoque)

Tri-base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
Água destilada	Para 1000 mL

O tampão foi autoclavado e mantido a 4°C. No momento do uso foi diluído em água destilada esterilizada para obter uma concentração final de 0,1x.

Solução EDTA 0,5 M pH 8,0

O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com NaOH 10 N. Para obtenção de EDTA 50 mM, diluiu-se esta solução dez vezes. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

Solução estoque de Tris-HCl 1 M pH 9,5

Tris-base 1 M

O pH foi ajustado para 9,5 com HCl p.a.

Gel de Agarose 0,8% (p/v) em Tampão TBE 1x.

Gel de Agarose 1,5% (p/v) em Tampão TBE 1x.

Marcador de peso molecular (DNA de fago lambda clivado com *Hind* III Gibco)

O marcador de peso molecular do DNA foi fornecido concentrado e no momento do uso, diluiu-se na proporção de 1 µL do marcador: 1 µL do tampão da amostra: 4 µL de água Milli-Q esterilizada. Na corrida eletroforética foi utilizado 2 µL do marcador.

Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100pb Ludwig Biotec)

O marcador de peso molecular foi fornecido concentrado e no momento do uso diluiu-se na proporção de 1 µL do marcador: 2 µL do tampão da amostra: 7 µL de água Milli-Q autoclavada. Na corrida eletroforética foram utilizados 3 µL do marcador.

GelRedTM (Biotium, Estados Unidos)

O *GelRedTM* foi adquirido a uma concentração de 10.000X em DMSO. (Após, 1µl deste e adicionado a 5000µl de Tampão de Amostra 6X, sendo nomeado agora de tampão *GelRedTM* 2x). Foram adicionados 3 µL de em cada 25 µL de amostra e a cada 10 µL de marcador. A utilização do tampão *GelRedTM* 2x dispensa a utilização do brometo de etídio.

Oligonucleotídeos (*Invitrogen*)

Foi adicionado Tris-HCl 10 mM pH7,0 aos oligonucleotídeos, para obter uma solução estoque com 50 µM. No momento do uso, a solução estoque foi diluída para concentração final de 4µM.

Sequenciamento das regiões ITS, EF e β-tubulina

Extração de DNA

Foram inoculados nove pontos de micélio em Placa de Petri com papel celofane esterilizado. Após três dias de crescimento o micélio novo foi retirado com auxílio de uma espátula esterilizada.

A extração de DNA foi realizada com o *PowerWater® DNA Isolation Kit* da *MO BIO Laboratories, Inc.*

ITS

A reação foi realizada com os oligonucleotídeos V9G e ITS4 , ambos universais para fungos que permitem amplificar a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal (Tabela 5 e Figura 10).

Tabela 5: sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação da região its1, 5,8s e its2 do dna ribossomal

Oligonucleotídeos	Sequências
V9G ¹	5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'
ITS4 ²	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Fonte: DE HOOG; GERRITS VAN DEN ENDE (1998)¹; WHITE; MORROW (1990)².

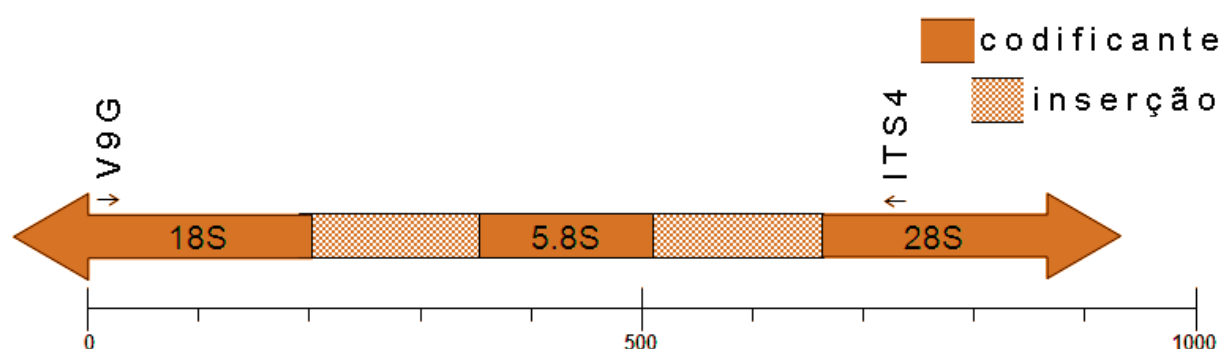


Figura 1: região its1-5,8s-its2 do DNA ribossomal

Fonte: STRINGARI (2009).

As condições da reação foram as descritas por Stringari (2009): 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de *Taq* polimerase, 0,06 μ M de *primers* (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, e volume final de 50 μ l. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf®* (Modelo: *Mastercycler Gradient*), com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72° C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®)*.

EF

A reação foi realizada com os oligonucleotídeos EF1-728F e EF-2, que amplifica a região α 1 do Fator de Elongação da tradução (Tabela 6, Figura 11).

Tabela 6: sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação da região α 1 do Fator de Elongação da tradução.

Oligonucleotídeos	Sequências
EF1-728F	5' CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG 3'
EF-2	5' GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT 3'

Fonte: CARBONE, KOHM (1999).

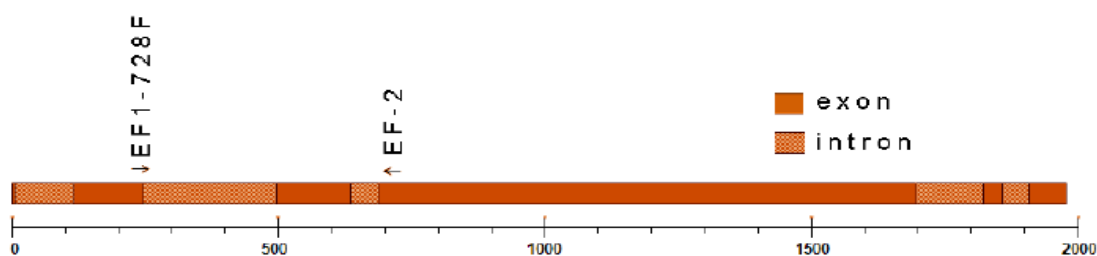


Figura 2: região α 1 do Fator de Elongação da tradução

Fonte: STRINGARI (2009).

As condições da reação foram as descritas por Stringari (2009): 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de *Taq* polimerase, 0,06 μ M de *primers* (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, e volume final de 50 μ l. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf®* (Modelo: *Mastercycler Gradient*), com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72° C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen®*).

β -tubulina

A reação foi realizada com os oligonucleotídeos Bt2a e Bt2b, que amplifica a região β -tubulina (Tabela 7, Figura 12).

Tabela 7: sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação da região Bt2a e Bt2b

Oligonucleotídeos	Sequências
Bt2a	5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3'
Bt2b	5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3'

Fonte: GLASS, DONALDSON (1995).

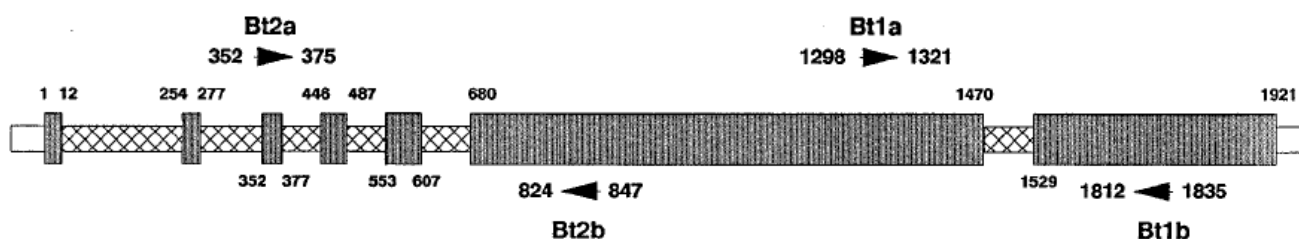


Figura 3: região Bt2a e Bt2b, que amplifica a região β -tubulina.

Fonte: GAISS, DONALDSON (1995).

As condições da reação foram as descritas por Glass e Donaldson (1995): 100 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,25U de *Taq* polimerase, 0,4 μ M de *primers* (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, e volume final de 25 μ L. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*® (Modelo: *Mastercycler Gradient*), com desnaturação inicial a 95° C por 3 minutos; 34 ciclos de 40 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguida de extensão final de 10 minutos a 72° C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*®)

Purificação do produto de PCR com Acetato de Amônio

Aos produtos da amplificação da PCR com os oligonucleotídeos foram acrescentados 34 μ L de acetato de amônio ($AcNH_4$) 7,5M e 100 μ L de etanol 96%. Os tubos ficaram em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 14000rpm. Os *pellets* resultantes foram lavados com 250 μ L de etanol 70% (recém preparado), centrifugou-se por 15 minutos a 14000rpm descartou-se o etanol. O *pellet* foi seco na estufa a 37°C por 30 min e ressuspensos em 15 μ L de água Milli-Q. Para confirmação da presença do DNA na amostra, 1 μ L foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Reação de Sequenciamento

Os sequenciamentos das regiões ITS1, 5,8S, ITS2, EF1-728F, EF-2, Bt2a e Bt2b foram realizados pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger *et al.* (1977), utilizando a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes, em sequenciador Automático de DNA megaBACE. Para a reação de sequenciamento foram utilizados cerca de 50ng da reação de PCR purificada, 0,2 μ M dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação e 4 μ L de mistura para sequenciamento ET (Kit: *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da Amersham Biosciences), completando com água milli-Q para um volume final de 10 μ L.

A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: *Mastercycler Gradient*), seguindo uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto; 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, 1 minuto e 5 segundos a 50°C, 4 minutos a 60°C, 20 min a 8°C.

Purificação da Reação de Sequenciamento com Acetato de Amônio

Ao produto da reação de sequenciamento realizado com produto de PCR purificado com acetato de amônio, foram adicionados 1 μ L de acetato de amônio (AcNH₄) 7,5M e 30 μ L de etanol 96%. Após a homogeneização por inversão 30 vezes a placa foi centrifugada por 45 minutos a 2500 RCF a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa seguido de um *spin* a 500 RCF, com a placa invertida sobre papel toalha. O *pellet* foi lavado com 100 μ L de etanol 70 % (recém preparado, não gelado). Seguindo-se uma nova centrifugação a 2500 RCF por 45 minutos, e o sobrenadante foi descartado por inversão da placa seguido de um *spin* a 750 RCF, com a placa invertida sobre papel toalha. Em seguida a placa ficou em estufa a 37°C durante 3 minutos. Após esse tratamento, cada amostra foi ressuspensa e tratada como nos itens anteriores. Todos os procedimentos, desde a reação de sequenciamento, foram realizados sob proteção de luz direta, cobrindo a placa com papel alumínio.

Edição e Análise das Sequências

As sequências foram inspecionadas visualmente através do programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999), após, foram alinhadas pelo *Muscle* e editadas utilizando-se o software MEGA 5 (KUMAR; TAMURA, NEI, 2009). Foram utilizadas como referências linhagens de *Pestalotiopsis* e outros gêneros como grupo externo, todas depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 8).

Tabela 8: linhagens de *Pestalotiopsis* e grupo externo.

Espécie	Número de acesso <i>Genbank</i>
<i>Pestalotiopsis glandicola</i> ¹	AB453839
<i>Pestalotiopsis longiseta</i> ¹	AB45385
<i>Pestalotiopsis sp</i> ¹	AB453859
<i>Pestalotiopsis crassiuscula</i> ¹	AB453836
<i>Pestalotiopsis japonica</i> ¹	AB453838
<i>Pestalotiopsis longisetula</i> ¹	AB453851
<i>Fusarium oxysporum</i> ¹	GU165966
<i>Pestalotiopsis lambertiae</i> ²	DQ657901
<i>Pestalotiopsis cruenta</i> ²	HM573303
<i>Pestalotiopsis acaciae</i> ²	AB453893
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i> ²	DQ787838
<i>Pestalotiopsis crassiuscula</i> ²	HM573250
<i>Pestalotiopsis gracilis</i> ²	HM573302
<i>Pestalotiopsis sinensis</i> ²	HM573292
<i>Fusarium mangiferae</i> ²	HM068872
<i>Pestalotiopsis microspora</i> ³	EF451800
<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> ³	GU722595
<i>Pestalotiopsis sp</i> ³	AF346561
<i>Cladophialophora carrionii</i> ³	HM989981

Fonte: o autor.

Nota: 1- referência e grupo externo de EF; 2- referência e grupo externo de β -tubulina; 3-- referência e grupo externo de ITS.

Análise Filogenética

Para construção filogenética da topologia e a estimativa dos ramos foram utilizados os algoritmo Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Bayesiana ,as árvores de parcimônia foram geradas com o auxílio do

programa PAUP (SWOFFORD, 2003), GARLI (ZWICKL, 2006) e MrBayes (Altekar, 2004) respectivamente.

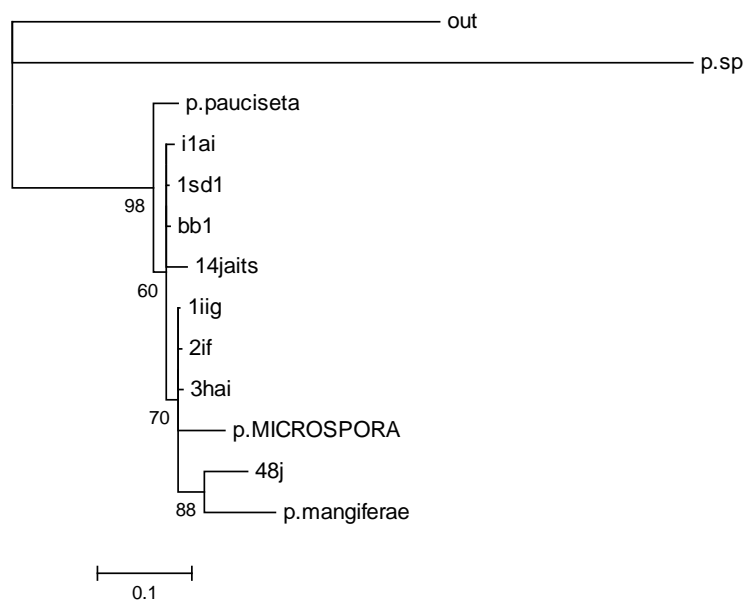


Figura 18: árvore filogenética da região ITS gerada através de análise Bayesiana.

Fonte: o autor

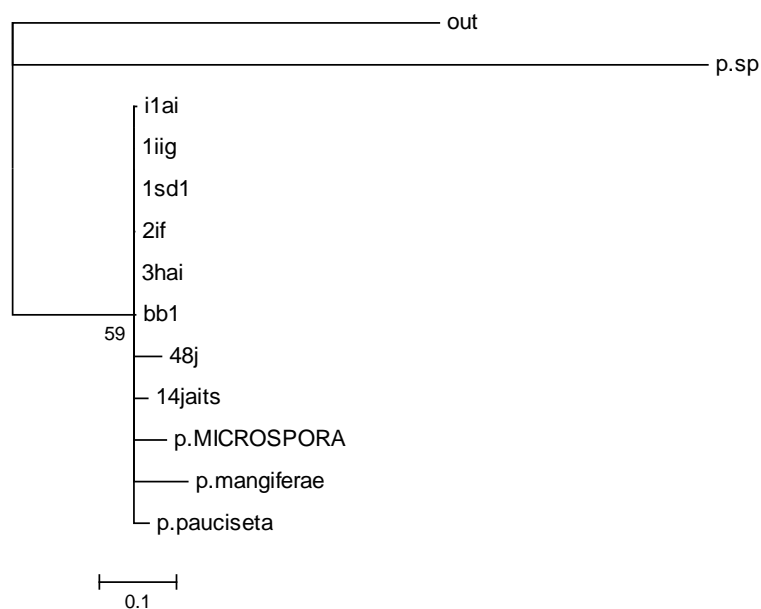


Figura 19: árvore filogenética da região ITS gerada através da análise Verossimilhança

Fonte: o autor

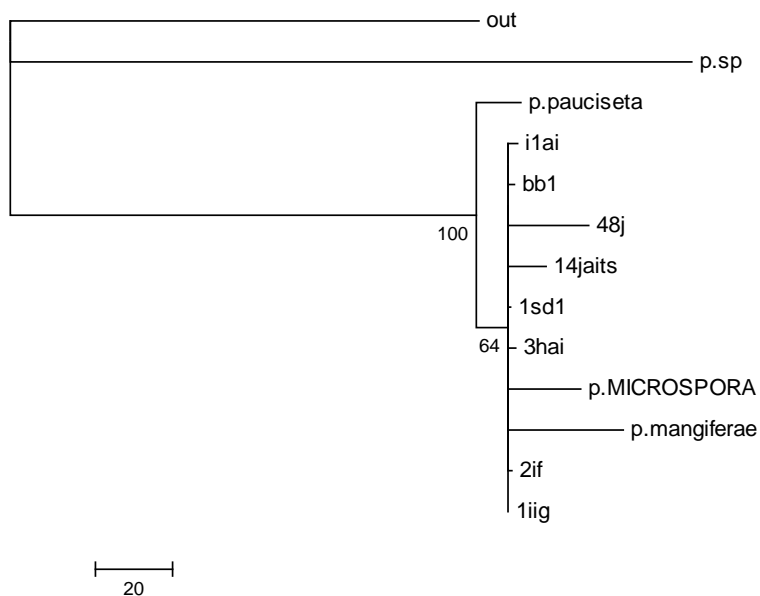


Figura 20: árvore filogenética da região ITS gerada através de análise Máxima Parcimônia.

Fonte: o autor

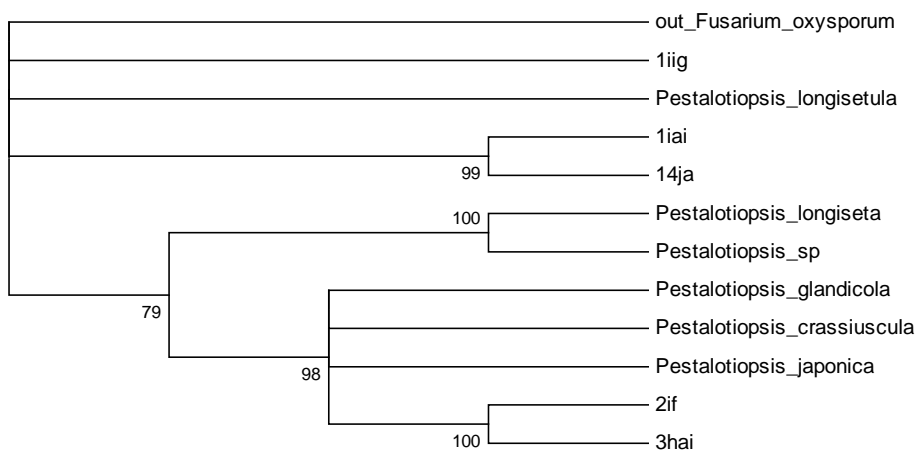


Figura 21: árvore filogenética da região EF gerada através de análise Bayesiana.

Fonte: o autor

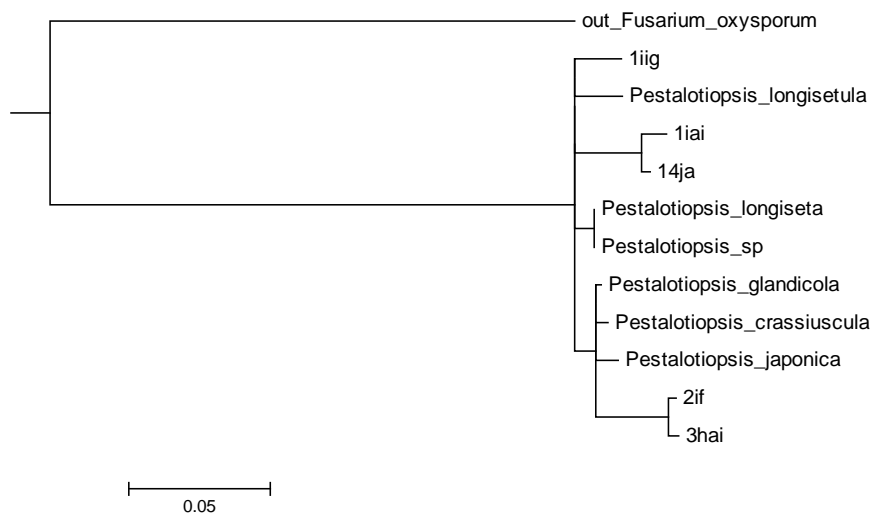


Figura 22: árvore filogenética da região EF gerada através da análise Verossimilhança.

Fonte: o autor

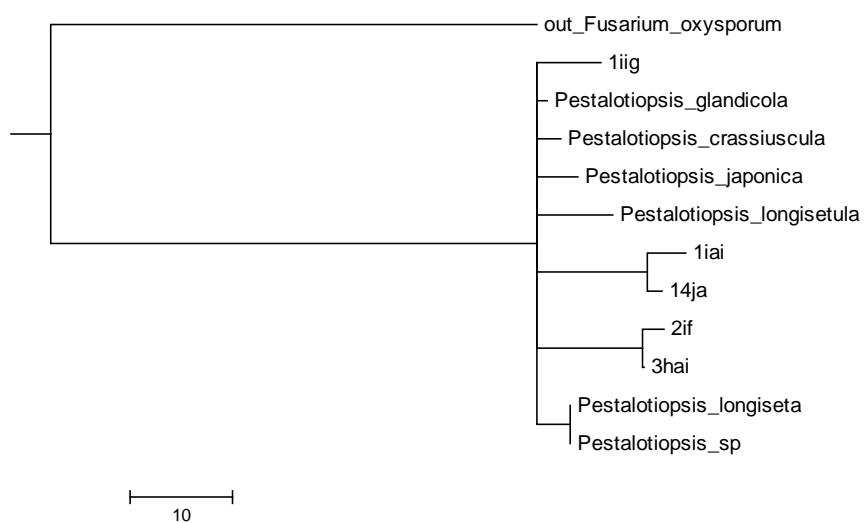


Figura 23 árvore filogenética da região EF gerada através da análise Máxima Parcimônia.

Fonte: o autor

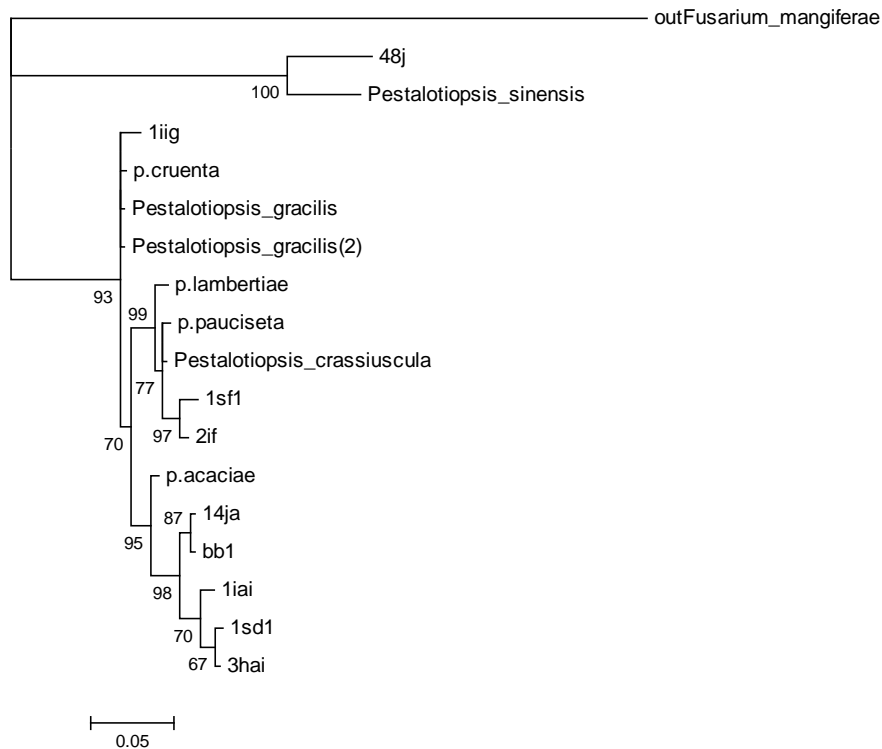


Figura 24: árvore filogenética da região β -Tubulina gerada através de análise Bayesiana.

Fonte: o autor

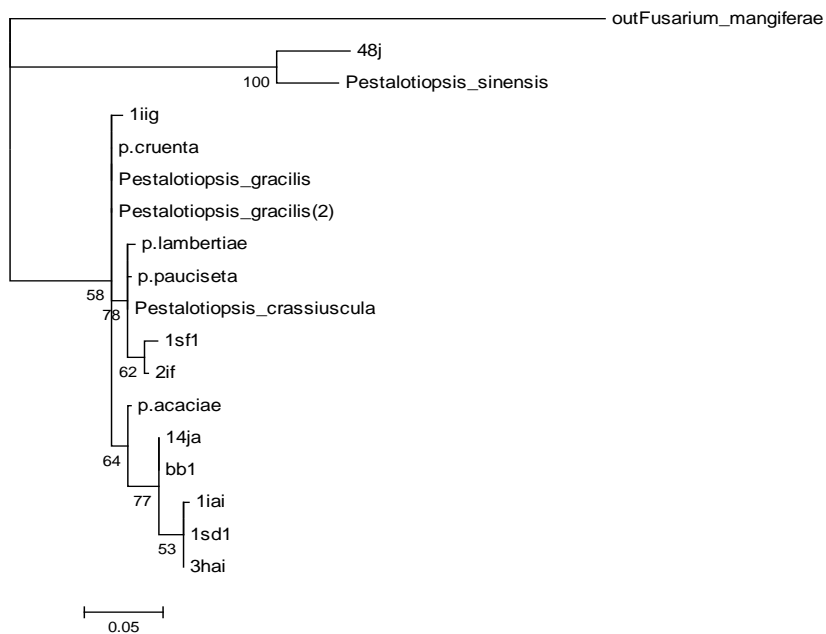


Figura 25: árvore filogenética da região β -Tubulina gerada através da análise Verossimilhança

Fonte: o autor

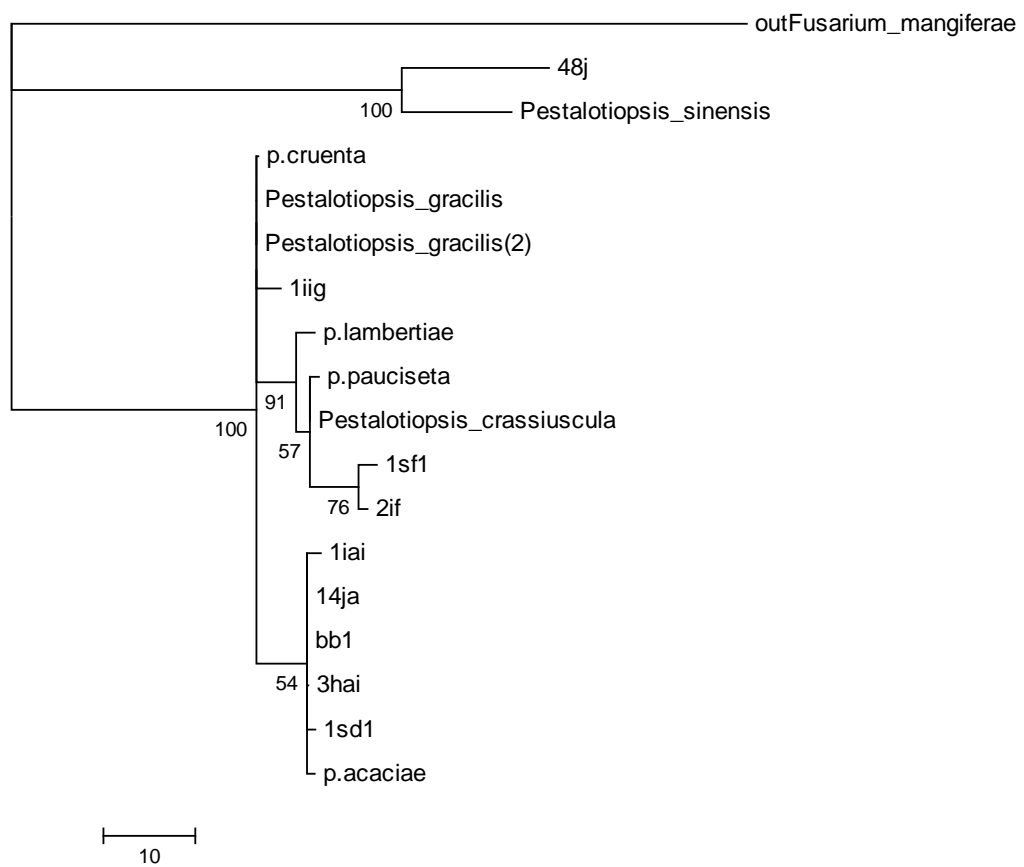


Figura 26: árvore filogenética da região β -Tubulina gerada através da análise Máxima Parcimônia.

Fonte: o autor

Conservação dos Fungos

Os fungos utilizados neste trabalho foram estocados utilizando-se tubo de ensaio contendo meio de cultura BDA inclinado, após sete dias de crescimento a 28°C foram mantidos a 4°C em geladeira, realizando-se repiques mensalmente; repetiu-se o procedimento a cada três meses.

Testes de Descoloração

Triagem Inicial do Potencial de Descoloração de fungos endofíticos em Meio Sólido

Foi avaliado o potencial de degradação de corantes da família Remazol por vinte e oito fungos endofíticos pertencentes aos gêneros *Colletotrichum* (5 espécies), *Guignardia* (10 espécies), *Pestalotiopsis* (9 espécies) e *Phomopsis* (4 espécies). Estas linhagens foram inoculadas em placas de petri contendo meio de saís sólido com 0,1 g/L de um dos corantes RB220, Remazol amarelo e Remazol vermelho. Após 15 dias de incubação a 28°C foi avaliado o potencial de descoloração através da formação de um halo descorado no meio de cultura, não observado no controle sem o inóculo.

Teste Inicial do Potencial de Degradação em Meio Líquido

Dois fungos, pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis*, com potencial de degradação em meio sólido foram selecionados e, cultivados em meio de saís sólido adicionado de nitrato de sódio (6 g/L) por sete dias, deste foram retirados blocos de micélio de quatro milímetros utilizando um furador de rolha. Dois blocos foram incubados por 15 dias em meio de saís líquido contendo 0,1g/L de RB220. A medição da absorbância dos sobrenadantes das amostras foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV-160A UV-vis, e utilizada para inferir a descoloração em cultura realizada pelos fungos. A porcentagem de descoloração em cultura foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Descoloração em cultura} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{cultura}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde A_{cultura} é a absorbância a 600nm do sobrenadante e A_{controle} é a absorbância a 600nm do sobrenadante de culturas não inoculadas contendo o corante. Os resultados são médias de ao menos três replicas.

Uso do corante como fonte de carbono e nitrogênio

Para otimização das fontes de carbono e nitrogênio foi utilizada a estratégia tradicional a qual varia um fator por vez, mantendo a condição previamente otimizada. Seis fontes de carbono foram adicionadas ao meio inicial sendo eles amido, frutose, glucose, sorbitol e galactose. Subsequentemente, foram testadas 3 fontes de nitrogênio: nitrato de sódio, uréia e tartarato de amônia. As concentrações utilizadas para os dois testes foram de 5, 10 e 15 g/L e, alternativamente foram avaliadas duas concentrações adicionais (0,1 e 1g/L).

Análises

Os resultados de otimização de meio de cultivo serão avaliados quanto à descoloração em cultura. Alternativamente será avaliada a atividade descorante, a qual consiste na medição do consumo do corante, em um período de 24 horas, quando aos sobrenadantes e micélios (derivados de culturas líquidas com 15 dias de crescimento) foram adicionadas a soluções contendo RB220. A 1mL de sobrenadante foi adicionado 0,1mL de solução de sais de corante a 1,1g/L. Já o micélio é incubado com 1,1 mL de solução de corante a 0,1 g/L. A atividade descorante foi calculada através da seguinte formula:

$$\text{Atividade descorante (\%)} = \frac{A_0 - A_{24}}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde A_{24} é a absorbância a 600 nm após 24 horas de incubação a 28°C e A_0 é a absorbância inicial da mistura reacional.

Fontes de carbono e nitrogênio

Para otimização das fontes de carbono e nitrogênio foi utilizada a estratégia tradicional a qual varia um fator por vez, mantendo a condição previamente otimizada. Seis fontes de carbono foram adicionadas ao meio inicial sendo eles amido, frutose, glucose, sorbitol e galactose. Subsequentemente, foram testadas 3 fontes de nitrogênio: nitrato de sódio, uréia e tartarato de amônia. As concentrações utilizadas para os dois testes foram de 5, 10 e 15 g/L e, alternativamente foram avaliadas duas concentrações adicionais (0,1 e 1g/L).

Fração ativa e mecanismo responsável pela descoloração

Os dados obtidos nos experimentos anteriores indicam que a atividade descorante é decorrente do micélio. Para confirmar que este é responsável pela descoloração e aferir se esta atividade é decorrente de ação enzimática o micélio foi seguido o protocolo descrito a seguir. O micélio fresco resultante de 15 dias de incubação no meio otimizado no item anterior, foi avaliado quanto à atividade descorante, na presença e ausência de azida sódica (0,44 mol/L), e alternativamente com o micélio autoclavado a 121°C com 1atm de pressão por 20 minutos.

Enzimas modificadoras de lignina (LMEs)

A atividade das principais enzimas ligninolíticas será verificada através das metodologias descritas abaixo. Os controles positivos utilizados serão uma linhagem de *Pleurotus ostreatus* que secreta Lac, e um fungo ainda não identificado, nomeado de 002, o qual secreta tanto MnP quanto MiP.

Oxidases totais

Será verificada pelo monitoramento da oxidação do ABTS (a 420 nm, em intervalos de 5 min durante 20min, em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC, através da metodologia de Machado e Matheus (2006) modificada. A mistura

de reação apresenta em 1mL: 0,85 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; micélio fresco; 0,05 mL de H_2O_2 2 mM e 0,1 mL de ABTS 5 mM. A reação terá início pela adição do ABTS. Uma unidade enzimática (UE) corresponderá à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Lacase

A atividade de Lac será determinada pela oxidação de ABTS (MACHADO e MATHEUS, 2006), conforme descrito acima, porém na ausência de H_2O_2 . Uma unidade enzimática (UE) corresponderá à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Peroxidases totais

A presença de peroxidases foi verificada com base nos valores obtidos para oxidasas totais com a subtração dos valores obtidos para lacase, pela seguinte fórmula:

$$\text{Peroxidases totais} = \text{absorbância oxidasas totais} - \text{absorbância lacase} \quad (3)$$

Caso o resultado apresente valores positivos, fica evidenciada a presença de peroxidases (lignina peroxidase e manganês peroxidase).

Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata, tanto para amostras quanto para controles. Os dados obtidos foram analisados através do programa ASSISTAT Versão 7.5 beta – 2010 (<http://www.assistat.com>), pela análise de variância (teste ANOVA), seguido da aplicação do teste Tukey para

a comparação das médias. Foram consideradas diferenças significativas entre as variáveis de cada tratamento quando $p < 0,01$. Os detalhes dos cálculos realizados podem ser encontrados nos apêndices 2,3,4,5,6,7,8.

APÊNDICE 2 ESTATÍSTICAS

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO- Análise do percentual de desoloração em difentes fontes de carbono isolado 14JA

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	24	16.22249	0.67594	6.2620 **
Resíduo	75	8.09566	0.10794	
Total	99	24.31815		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

Amido	5g/L	0.73325 abcde
Amido	10g/L	0.51700 bcde
Amido	15g/L	0.97700 abcde
Amido	0,1g/L	1.34250 ab
Amido	1g/L	1.26175 abc
Frutose	5g/L	1.45200 a
Frutose	10g/L	1.06600 abcd
Frutose	15g/L	1.55575 a
Frutose	0,1g/L	1.12575 abcd
Frutose	1g/L	1.09900 abcd

Glicose 5g/L	0.41050	cde
Glicose 10g/L	0.56825	bcde
Glicose 15g/L	0.85500	abcde
Glicose 0,1g/L	1.14600	abcd
Glicose 1g/L	1.11275	abcd
Sorbitol 5g/L	0.77425	abcde
Sorbitol 10g/L	1.07300	abcd
Sorbitol 15g/L	1.54925	a
Sorbitol 0,1g/L	1.22750	abc
Sorbitol 1g/L	1.21150	abc
Galactose 5g/L	0.11350	e
Galactose 10g/L	0.29875	de
Galactose 15g/L	0.18250	e
Galactose 0,1g/	1.21650	abc
Galactose 1g/L	1.15375	abcd

DMS = 0.88267

MG = 0.96092

CV% = 34.19072

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

.395	.733	.830	.975
.156	.178	.851	.883
.134	1.022	1.125	1.627
1.368	1.326	1.331	1.345

1.251	1.253	1.263	1.280
1.434	1.504	1.438	1.432
1.355	1.337	1.337	.235
.728	2.075	1.680	1.740
1.172	1.187	1.144	1.000
1.052	1.130	1.089	1.125
.413	.371	.421	.437
.104	1.004	.752	.413
.283	1.222	.991	.924
1.097	1.095	1.180	1.212
1.174	1.116	1.037	1.124
.073	.076	1.672	1.276
1.854	.706	1.174	.558
1.268	1.747	1.724	1.458
1.188	1.173	1.301	1.248
1.206	1.216	1.228	1.196
.137	.074	.119	.124
.529	.117	.305	.244
.090	.167	.198	.275
1.258	1.216	1.216	1.176
1.176	1.161	1.138	1.140

SIGLAS E ABREVIATÖES

F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO - Análise do percentual de desoloração em difentes fontes de carbono isolado 48J

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	24	7.49675	0.31236	17.2739 **
Resíduo	75	1.35622	0.01808	
Total	99	8.85297		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

Amido	5g/L	0.13275	i
Amido	10g/L	0.21975	hi
Amido	15g/L	0.32925	fghi
Amido	0,1g/L	0.60900	cdefg
Amido	1g/L	0.66250	cdefg
Frutose	5g/L	0.17425	i
Frutose	10g/L	0.12225	i
Frutose	15g/L	0.17800	i
Frutose	0,1g/L	1.04125	ab
Frutose	1g/L	0.84300	abc
Glicose	5g/L	0.12425	i
Glicose	10g/L	0.37000	efghi
Glicose	15g/L	0.46725	defghi

Glicose 0,1g/L 1.08550 a
 Glicose 1g/L 0.66650 cdef
 Sorbitol 5g/L 0.31950 fghi
 Sorbitol 10g/L 0.32600 fghi
 Sorbitol 15g/L 0.42300 efghi
 Sorbitol 0,1g/L 0.30425 ghi
 Sorbitol 1g/L 0.38400 efghi
 Galactose 5g/L 0.42150 efghi
 Galactose 10g/L 0.54425 cdefgh
 Galactose 15g/L 0.71475 bcde
 Galactose 0,1g/L 0.80600 abcd
 Galactose 1g/L 0.23150 hi

DMS = 0.36128

MG = 0.46001 CV% = 29.23263

As médias seguidas pela mesma letra não diferem
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

.229	.148	.020	.134
.270	.198	.180	.231
.115	.112	.893	.197
.815	.609	.616	.396
.754	.655	.778	.463
.197	.126	.138	.236
.191	.071	.141	.086
.087	.172	.207	.246
1.118	.802	1.040	1.205

.843	.877	.866	.786
.105	.096	.128	.168
.425	.356	.377	.322
.282	.366	.590	.631
1.079	.984	1.199	1.080
.713	.666	.555	.732
.314	.215	.352	.397
.472	.498	.151	.183
.389	.635	.144	.524
.168	.284	.465	.300
.472	.278	.406	.380
.374	.467	.465	.380
.532	.350	.578	.717
.611	.785	.785	.678
.815	.806	.983	.620
.231	.290	.213	.192

SIGLAS E ABREVIACÕES

F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO- Peso seco de micélio
isolado 14JA- fonte de carbono

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	24	2.60280	0.10845	12.7513 **
Resíduo	75	0.63788	0.00851	
Total	99	3.24068		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

Amido 5g/L	0.32000	abcdef
Amido 10g/L	0.36425	abcde
Amido 15g/L	0.39950	abc
Amido 0,1g/L	0.00275	g
Amido 1g/L	0.00300	g
Frutose 5g/L	0.07750	fg
Frutose 10g/L	0.21100	bcdefg
Frutose 15g/L	0.18000	cdefg
Frutose 0,1g/L	0.00250	g
Frutose 1g/L	0.00350	g
Glicose 5g/L	0.29475	abcdef
Glicose 10g/L	0.43450	ab
Glicose 15g/L	0.48600	a

Glicose 0,1g/L	0.00200	g
Glicose 1g/L	0.00400	g
Sorbitol 5g/L	0.23625	bcdefg
Sorbitol 10g/L	0.38225	abcd
Sorbitol 15g/L	0.04375	g
Sorbitol 0,1g/L	0.00375	g
Sorbitol 1g/L	0.00325	g
Galactose 5g/L	0.12750	efg
Galactose 10g/L	0.18050	cdefg
Galactose 15g/L	0.15125	defg
Galactose 0,1g/L	0.00275	g
Galactose 1g/L	0.00275	g

DMS = 0.24777

MG = 0.15677 CV% = 58.82677

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

.184	.437	.336	.323
.366	.437	.337	.317
.410	.408	.402	.378
.002	.005	.002	.002
.004	.002	.002	.004
.051	.044	.170	.045
.096	.108	.205	.435
.356	.277	.026	.061
.004	.004	.001	.001

.005	.001	.004	.004
.287	.311	.274	.307
.601	.337	.398	.402
.619	.459	.387	.479
.002	.001	.004	.001
.002	.005	.003	.006
.238	.082	.114	.511
.427	.481	.059	.562
.046	.037	.020	.072
.005	.005	.002	.003
.004	.001	.003	.005
.149	.152	.127	.082
.016	.249	.344	.113
.184	.286	.079	.056
.002	.006	.001	.002
.002	.004	.002	.003

SIGLAS E ABREVIACÕES

F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO- Peso seco de micélio isolado 48J- fonte de carbono

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	24	5.20971	0.21707	73.2738 **
Resíduo	75	0.22219	0.00296	
Total	99	5.43189		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

Amido 5g/L	0.60075 a
Amido 10g/L	0.57350 ab
Amido 15g/L	0.00250 f
Amido 0,1g/L	0.00400 f
Amido 1g/L	0.51850 abc
Frutose 5g/L	0.43775 bcde
Frutose 10g/L	0.30975 e
Frutose 15g/L	0.00200 f
Frutose 0,1g/L	0.00250 f
Frutose 1g/L	0.54575 ab
Glicose 5g/L	0.46600 abcd
Glicose 10g/L	0.38100 cde
Glicose 15g/L	0.00275 f

Glicose 0,1g/L	0.00300	f
Glicose 1g/L	0.55375	ab
Sorbitol 5g/L	0.32625	de
Sorbitol 10g/L	0.31600	e
Sorbitol 15g/L	0.00225	f
Sorbitol 0,1g/L	0.00300	f
Sorbitol 1g/L	0.38675	cde
Galactose 5g/L	0.36350	de
Galactose 15g/L	0.43725	bcde
Galactose 0,1g/L	0.00150	f
Galactose 1g/L	0.00275	f

DMS = 0.14623

MG = 0.26764 CV% = 20.33648

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

.438	.409	.352	.594
.488	.685	.666	.564
.625	.606	.528	.535
.001	.001	.004	.004
.002	.006	.004	.004
.584	.466	.456	.568
.443	.393	.450	.465
.290	.298	.301	.350
.003	.003	.001	.001
.003	.003	.003	.001

.542	.606	.508	.527
.312	.434	.628	.490
.393	.483	.328	.320
.005	.001	.002	.003
.002	.002	.004	.004
.515	.639	.558	.503
.322	.289	.356	.338
.311	.319	.333	.301
.004	.003	.001	.001
.003	.004	.003	.002
.382	.434	.352	.379
.369	.385	.366	.334
.621	.359	.383	.386
.001	.001	.003	.001
.002	.001	.004	.004

SIGLAS E ABREVIACÕES

F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO - Análise do percentual de desoloração em difentes fontes de nitrogenio isolado 14JA

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	8	0.24004	0.03001	7.0956 **
Resíduo	27	0.11418	0.00423	
Total	35	0.35422		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

Nitrato de sódio 5g/L	0.32400 a
Nitrato de sódio 10g/L	0.29050 ab
Nitrato de sódio 15g/L	0.24375 abc
Uréia 5g/L	0.24075 abc
Uréia 10g/L	0.09950 cd
Uréia 15g/L	0.06365 d
Tartarato de amônio 5g/L	0.22900 abc
Tartarato de amônio10g/L	0.26325 ab
Tartarato de amônio15g/L	0.16825 bcd

DMS = 0.15477

MG = 0.21363

CV% = 30.44018

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

```

-----
.3180 .3270 .3310 .3200
.2990 .2540 .2540 .3550
.2780 .2680 .2540 .1750
.1550 .2560 .2670 .2850
.0790 .1310 .0800 .1080
.0830 .0510 .0570 .0636
.2430 .2240 .2200 .2290
.5180 .1720 .1830 .1800
.1710 .1560 .1930 .1530
-----

```

SIGLAS E ABREVIACÕES

F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO- Análise do percentual de desoloração em difentes fontes de nitrogenio isolado 48j

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	8	0.53070	0.06634	84.5896 **
Resíduo	27	0.02117	0.00078	
Total	35	0.55187		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

Nitrato de sódio 5g/L	0.52625	bc
Nitrato de sódio 10g/L	0.41400	d
Nitrato de sódio 15g/L	0.48550	c
Uréia 5g/L	0.57575	ab
Uréia 10g/L	0.59500	a
Uréia 15g/L	0.53650	abc
Tartarato de amônio5g/L	0.18325	e
Tartarato de amônio10g/L	0.38375	d
Tartarato de amônio15g/L	0.54250	abc

DMS = 0.06665

MG = 0.47139

CV% = 5.94074

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

```

-----
.522 .529 .523 .531
.414 .410 .415 .417
.487 .489 .477 .489
.542 .603 .557 .601
.588 .577 .635 .580
.509 .557 .523 .557
.171 .137 .225 .200
.360 .367 .395 .413
.563 .535 .475 .597
-----

```

SIGLAS E ABREVIACÕES

F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO- Peso seco de micélio isolado 14JA- fonte de nitrogênio

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	8	0.00123	0.00015	0.9960 ns
Resíduo	27	0.00417	0.00015	
Total	35	0.00541		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

Nitrato de sódio 5g/L	0.00775 a
Nitrato de sódio 10g/L	0.01025 a
Nitrato de sódio 15g/L	0.02450 a
Uréia 5g/L	0.01325 a
Uréia 10g/L	0.01925 a
Uréia 15g/L	0.01700 a
Tartarato de amônio 5g/L	0.00700 a
Tartarato de amônio 10g/L	0.01100 a
Tartarato de amônio 15g/L	0.00625 a

DMS = 0.02959

MG = 0.01292 CV% = 96.26821

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

```

-----
.010 .008 .006 .007
.006 .007 .008 .020
.031 .042 .010 .015
.001 .010 .011 .031
.006 .049 .007 .015
.001 .050 .009 .008
.007 .006 .005 .010
.015 .018 .009 .002
.003 .006 .010 .006
-----

```

SIGLAS E ABREVIACÕES

F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade
 S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio
 F = Estatística do teste F MG = Média geral
 CV% = Coeficiente de variação em %
 DMS = Diferença mínima significativa

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO - Peso seco de micélio isolado 48J- fonte de nitrogênio.

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	8	0.02748	0.00343	0.9591 ns
Resíduo	27	0.09668	0.00358	
Total	35	0.12416		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

Nitrato de sódio 5g/L	0.00550 a
Nitrato de sódio 10g/L	0.00400 a
Nitrato de sódio 15g/L	0.00475 a
Uréia 5g/L	0.00375 a
Uréia 10g/L	0.00125 a
Uréia 15g/L	0.00400 a
Tartarato de amônio 5g/L	0.00675 a
Tartarato de amônio 10g/L	0.09275 a
Tartarato de amônio 15g/L	0.01325 a

DMS = 0.14242

MG = 0.01511

CV% = 396.00248

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

DADOS

```

-----
.005 .004 .006 .007
.002 .004 .003 .007
.004 .007 .005 .003
.004 .005 .003 .003
.002 .001 .001 .001
.002 .002 .004 .008
.021 .004 .001 .001
.003 .005 .003 .360
.002 .007 .042 .002
-----

```

SIGLAS E ABREVIACÕES

F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

APÊNDICE 3-SEQUÊNCIAS DO *GENBANK*

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região ITS, utilizadas na comparação com o isolado 48J.

APÊNDICE 3-SEQUÊNCIAS DO *GENBANK*

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região ITS, utilizadas na comparação com o isolado 48J.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
gil1338728051EF451801.1	Pestalotiopsis vismiae isolate 48JAES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1890	1890	100%	0.0	100%	
gil1899094741EU552146.1	Pestalotiopsis maculiformans culture-collection CBS:119350 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1339	1339	87%	0.0	96%	
gil1899094751EU552147.1	Pestalotiopsis maculiformans culture-collection CBS:122683 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1296	1296	84%	0.0	96%	
gil2915011971GU591998.1	Pestalotiopsis sp. MA21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1	1219	1219	70%	0.0	97%	
gil3008724241HMS37054.1	Fungal endophyte sp. q77 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1200	1200	64%	0.0	99%	
gil2529722151AB511815.1	Pestalotiopsis sp. O5 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete 18S rRNA	1198	1198	75%	0.0	96%	
gil2186646201FJ481027.1	Pestalotiopsis vismiae strain xsd08116 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1178	1178	63%	0.0	99%	
gil2810213001GU183121.1	Pestalotiopsis disseminata strain NRRL 36915 internal transcribed spacer 1	1173	1173	73%	0.0	97%	
gil1622859361EU326213.1	Pestalotiopsis vismiae isolate XSD-67 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1167	1167	63%	0.0	98%	
gil2973755371HM068372.1	Pestalotiopsis sp. B2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1	1165	1165	63%	0.0	98%	
gil1132082811AB251916.1	Pestalotiopsis vismiae genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, partial actin	1165	1165	62%	0.0	99%	
gil2924536571GU721793.1	Uncultured fungus clone f3HSc73 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1161	1161	64%	0.0	98%	
gil21213100461AF377290.1	Pestalotia hansenii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1	1148	1148	61%	0.0	99%	
gil1621360421EU273510.1	Pestalotiopsis vismiae isolate XSD-31 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1138	1138	63%	0.0	98%	
gil1295625411EF419938.1	Fungal endophyte isolate 9220 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1138	1138	63%	0.0	98%	
gil244176041AF409977.1	Pestalotiopsis vismiae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1	1134	1134	60%	0.0	99%	

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região β -tubulina, utilizadas na comparação com o isolado 48J.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Link
gi 125658088 EF055227.1	Pestalotiopsis cocculi strain DFFW beta-tubulin gene, partial sequen	729	729	99%	0.0	99%	
gi 125658117 EF055256.1	Pestalotiopsis vismiae strain PC9C beta-tubulin gene, partial sequenc	604	604	99%	1e-169	94%	
gi 125658116 EF055255.1	Pestalotiopsis vismiae strain J15DW beta-tubulin gene, partial sequer	604	604	99%	1e-169	94%	
gi 311418588 HM573292.1	Pestalotiopsis sinensis strain QQ-TJZ beta-tubulin gene, partial sequ	725	725	99%	0.0	99%	
gi 311418516 HM573239.1	Pestalotiopsis cocculi strain HHL-BZ beta-tubulin gene, partial seque	725	725	99%	0.0	99%	
gi 205824971 AB453889.1	Pestalotiopsis neglecta tub2 gene for beta tubulin, strain: TAP20006	725	725	99%	0.0	99%	
gi 72536239 DQ141531.1	Pestalotiopsis neglecta strain PSHI2002Endo404 beta-tubulin gene, p	725	725	99%	0.0	99%	
gi 72536238 DQ141530.1	Pestalotiopsis neglecta strain PSHI2002Endo401 beta-tubulin gene, p	725	725	99%	0.0	99%	
gi 72536237 DQ141529.1	Pestalotiopsis neglecta strain PSHI2002Endo315 beta-tubulin gene, p	719	719	99%	0.0	99%	
gi 112785093 DQ787835.1	Pestalotiopsis osyridis strain PSHI2002Endo643 beta-tubulin gene, p	712	712	99%	0.0	99%	
gi 72536240 DQ141532.1	Pestalotiopsis neglecta strain PSHI2002Endo502 beta-tubulin gene, p	712	712	99%	0.0	99%	
gi 85720541 DQ333579.1	Pestalotiopsis microspora strain PSHI2002Endo747 beta-tubulin gene	712	712	99%	0.0	99%	
gi 310645218 HM536979.1	Pestalotiopsis microspora strain PSHI2002Endo1015 beta-tubulin gene	692	692	99%	0.0	98%	
gi 205824983 AB453892.1	Pestalotiopsis disseminata tub2 gene for beta tubulin, strain: TAP29C	679	679	99%	0.0	97%	
gi 283487853 GU294730.1	Pestalotiopsis uvicola strain UCD2465TX beta-tubulin (BT) gene, par	673	673	99%	0.0	97%	
gi 205824979 AB453891.1	Pestalotiopsis disseminata tub2 gene for beta tubulin, strain: MAFF 2	673	673	99%	0.0	97%	
gi 85720539 DQ333577.1	Pestalotiopsis lawsoniae strain PSH20001-057 beta-tubulin gene, par	667	667	99%	0.0	96%	
gi 85720537 DQ333575.1	Pestalotiopsis disseminata strain PSH20001-066 beta-tubulin gene, p	665	665	99%	0.0	97%	
gi 311418597 HM573299.1	Pestalotiopsis flavidula strain QQ-TQZ beta-tubulin gene, partial seq	644	644	99%	0.0	95%	
gi 311418596 HM573298.1	Pestalotiopsis flavidula strain QQ-TPZ beta-tubulin gene, partial seq	644	644	99%	0.0	95%	
gi 311418594 HM573297.1	Pestalotiopsis flavidula strain QQ-TOZ beta-tubulin gene, partial seq	644	644	99%	0.0	95%	
gi 311418579 HM573285.1	Pestalotiopsis neglecta strain QQ-TCZ beta-tubulin gene, partial seq	644	644	99%	0.0	95%	

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região EF, utilizadas na comparação com o isolado 48J.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi 205825144 AB453839.1	Pestalotiopsis glandicola EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	717	717	95%	0.0	96%
gi 205825108 AB453857.1	Pestalotiopsis longiseta EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	717	717	95%	0.0	96%
gi 205824931 AB453859.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K02 EF1a gene for elongation factor 1 alpha	717	717	95%	0.0	96%
gi 205825089 AB453852.1	Pestalotiopsis glandicola EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	712	712	95%	0.0	96%
gi 205825141 AB453838.1	Pestalotiopsis japonica EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	704	704	93%	0.0	96%
gi 205825133 AB453836.1	Pestalotiopsis crassiuscula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, :	696	696	95%	0.0	96%
gi 205825163 AB453845.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K01 EF1a gene for elongation factor 1 alpha	694	694	95%	0.0	96%
gi 205825157 AB453843.1	Pestalotiopsis acaciae EF1a gene for elongation factor 1 alpha, strai	673	673	95%	0.0	95%
gi 205825087 AB453851.1	Pestalotiopsis longisetula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, st	673	673	95%	0.0	95%
gi 205825155 AB453842.1	Pestalotiopsis crassiuscula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, :	664	664	93%	0.0	95%
gi 308211186 HQ022659.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB229 translation elong	646	646	84%	0.0	96%
gi 308211185 HQ022658.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain LA69 translation elong	646	646	84%	0.0	96%
gi 308211196 HQ022669.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain PP98 translation elong	642	642	83%	0.0	96%
gi 308211180 HQ022653.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB116 translation elong	640	640	84%	2e-180	96%
gi 308211179 HQ022652.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IQ130 translation elong	640	640	84%	2e-180	96%
gi 308211178 HQ022651.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB228 translation elong	640	640	84%	2e-180	96%
gi 308211177 HQ022650.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM156 translation elor	640	640	84%	2e-180	96%
gi 308211184 HQ022657.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain LA17 translation elong	635	635	84%	9e-179	96%
gi 308211183 HQ022656.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM173 translation elor	635	635	84%	9e-179	96%

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região EF, utilizadas na comparação com o isolado 14JA.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
gi 205825144 AB453839.1	Pestalotiopsis glandicola EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	694	694	96%	0.0	96%	
gi 205825108 AB453857.1	Pestalotiopsis longiseta EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	689	689	96%	0.0	96%	
gi 205824931 AB453859.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K02 EF1a gene for elongation factor 1 alpha	689	689	96%	0.0	96%	
gi 205825089 AB453852.1	Pestalotiopsis glandicola EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	687	687	96%	0.0	96%	
gi 205825141 AB453838.1	Pestalotiopsis japonica EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	671	671	95%	0.0	95%	
gi 205825163 AB453845.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K01 EF1a gene for elongation factor 1 alpha	667	667	95%	0.0	96%	
gi 205825133 AB453836.1	Pestalotiopsis crassiuscula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, :	667	667	96%	0.0	95%	
gi 205825087 AB453851.1	Pestalotiopsis longisetula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, st	664	664	93%	0.0	96%	
gi 308211196 HQ022669.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain PP98 translation elong	658	658	87%	0.0	97%	
gi 308211186 HQ022659.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB229 translation elong	656	656	88%	0.0	97%	
gi 308211185 HQ022658.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain LA69 translation elong	656	656	88%	0.0	97%	
gi 308211180 HQ022653.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB116 translation elong	650	650	88%	0.0	96%	
gi 308211179 HQ022652.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IQ130 translation elong	650	650	88%	0.0	96%	
gi 308211178 HQ022651.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB228 translation elong	650	650	88%	0.0	96%	
gi 308211177 HQ022650.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM156 translation elor	650	650	88%	0.0	96%	
gi 308211184 HQ022657.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain LA17 translation elong	644	644	88%	0.0	96%	
gi 308211183 HQ022656.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM173 translation elor	644	644	88%	0.0	96%	
gi 205825157 AB453843.1	Pestalotiopsis acaciae EF1a gene for elongation factor 1 alpha, strai	644	644	96%	0.0	94%	
gi 308211191 HQ022664.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM177 translation elor	642	642	87%	0.0	96%	
gi 308211188 HQ022661.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain PP105 translation elong	642	642	88%	0.0	96%	
gi 308211187 HQ022660.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB84b translation elong	642	642	88%	0.0	96%	

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região β -tubulina, utilizadas na comparação com o isolado 14JA.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
gi 205824986 AB453893.1	Pestalotiopsis acaciae tub2 gene for beta tubulin, strain: TAP31O08	725	725	99%	0.0	98%	
gi 311418602 HM573302.1	Pestalotiopsis gracilis strain THS-BZ beta-tubulin gene, partial seque	708	708	99%	0.0	98%	
gi 311418573 HM573280.1	Pestalotiopsis palmarum strain QQ-NZ beta-tubulin gene, partial sequ	708	708	99%	0.0	98%	
gi 311418522 HM573242.1	Pestalotiopsis gracilis strain HHL-FG beta-tubulin gene, partial seque	708	708	99%	0.0	98%	
gi 311418603 HM573303.1	Pestalotiopsis cruenta strain THS-CZ beta-tubulin gene, partial sequ	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418614 HM573310.1	Pestalotiopsis palmarum strain THS-JZ beta-tubulin gene, partial seq	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418613 HM573309.1	Pestalotiopsis cruenta strain THS-IZ beta-tubulin gene, partial seque	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418607 HM573308.1	Pestalotiopsis virgatula strain THS-HZ beta-tubulin gene, partial seq	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418605 HM573305.1	Pestalotiopsis matildae strain THS-EZ beta-tubulin gene, partial seq	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418605 HM573304.1	Pestalotiopsis virgatula strain THS-DZ beta-tubulin gene, partial seq	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418576 HM573282.1	Pestalotiopsis virgatula strain QQ-PZ beta-tubulin gene, partial sequ	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418574 HM573281.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-OZ beta-tubulin gene, partial sequer	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418572 HM573279.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-MZ beta-tubulin gene, partial sequer	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418566 HM573275.1	Pestalotiopsis aquatica strain QQ-IZ beta-tubulin gene, partial seque	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418565 HM573274.1	Pestalotiopsis virgatula strain QQ-HZ beta-tubulin gene, partial sequ	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418562 HM573272.1	Pestalotiopsis menezesiana strain QQ-FZ beta-tubulin gene, partial s	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418560 HM573270.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-DZ beta-tubulin gene, partial sequer	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418559 HM573269.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-CZ beta-tubulin gene, partial sequer	702	702	99%	0.0	97%	
gi 311418513 HM573237.1	Pestalotiopsis zonata strain BGR-AY beta-tubulin gene, partial seque	702	702	99%	0.0	97%	
gi 205824993 AB453895.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K01 tub2 gene for beta tubulin	702	702	99%	0.0	97%	
gi 112785102 DQ787844.1	Pestalotia vaccinii strain PSHI2004Endo424 beta-tubulin gene, partia	702	702	99%	0.0	97%	

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região ITS, utilizadas na comparação com o isolado 14JA.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF451799.1	Pestalotiopsis sp. 14JAES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	1175	1175	99%	0.0	100%
AF346561.1	Pestalotiopsis sp. NG12-30 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1079	1079	97%	0.0	98%
GU722595.1	Pestalotiopsis mangiferae isolate MM 102 18S ribosomal RNA gene, pa	1070	1070	97%	0.0	97%
EF451802.1	Pestalotiopsis microspora isolate 6JAES 18S ribosomal RNA gene, part	1070	1070	99%	0.0	96%
EF451803.1	Pestalotiopsis sp. 9JAES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; ii	1064	1064	99%	0.0	96%
EF451800.1	Pestalotiopsis microspora isolate 29SES 18S ribosomal RNA gene, parl	1031	1031	99%	0.0	95%
EF451804.1	Pestalotiopsis sp. SD01ES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	1022	1022	99%	0.0	95%
GQ891045.1	Pestalotiopsis pauciseta isolate VM1 18S ribosomal RNA gene, partial	946	946	88%	0.0	97%
EU686163.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 290 18S ribosomal RNA gene,	909	909	78%	0.0	99%
GU592005.1	Pestalotiopsis sp. MA165 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	900	900	76%	0.0	100%
EU638329.1	Pestalotiopsis sp. Y1 internal transcribed spacer 1, partial sequence;	900	900	76%	0.0	100%
GU056016.1	Uncultured Xylariales isolate BV3_03_07_I9 18S ribosomal RNA gene,	898	898	78%	0.0	99%
EU686184.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 315 18S ribosomal RNA gene,	898	898	77%	0.0	99%
EU686171.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 300 18S ribosomal RNA gene,	898	898	77%	0.0	99%
GU991816.1	Uncultured Ascomycota clone 1.5 18S ribosomal RNA gene, partial se	894	894	78%	0.0	99%
GQ254681.1	Pestalotiopsis sp. MA129 internal transcribed spacer 1, partial sequer	894	894	76%	0.0	99%
GU056015.1	Uncultured Xylariales isolate 6.38_P1 18S ribosomal RNA gene, partial	894	894	78%	0.0	99%
EU644755.1	Pestalotiopsis sp. PII-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; in	894	894	76%	0.0	99%
FJ904850.1	Pestalotiopsis sp. GR199 18S ribosomal RNA, internal transcribed spac	893	893	76%	0.0	99%

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região ITS, utilizadas na comparação com o isolado BB1.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi 13123767 AF346561.1	Pestalotiopsis sp. NG12-30 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1088	1088	100%	0.0	98%
gi 292397875 GU722595.1	Pestalotiopsis mangiferae isolate MM 102 18S ribosomal RNA gene, p	1056	1056	99%	0.0	98%
gi 133872803 EF451799.1	Pestalotiopsis sp. 14JAES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	1037	1037	98%	0.0	98%
gi 133872807 EF451803.1	Pestalotiopsis sp. 9JAES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	1015	1015	96%	0.0	98%
gi 133872804 EF451800.1	Pestalotiopsis microspora isolate 29SES 18S ribosomal RNA gene, par	998	998	99%	0.0	97%
gi 133872806 EF451802.1	Pestalotiopsis microspora isolate 6JAES 18S ribosomal RNA gene, par	987	987	98%	0.0	97%
gi 260600340 GQ891045.1	Pestalotiopsis pauciseta isolate VM1 18S ribosomal RNA gene, partial	985	985	100%	0.0	96%
gi 133872808 EF451804.1	Pestalotiopsis sp. SD01ES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	975	975	99%	0.0	96%
gi 187939450 EU686163.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 290 18S ribosomal RNA gene	958	958	88%	0.0	98%
gi 291501204 GU592005.1	Pestalotiopsis sp. MA165 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	948	948	87%	0.0	99%
gi 186920402 EU638329.1	Pestalotiopsis sp. Y1 internal transcribed spacer 1, partial sequence;	948	948	87%	0.0	99%
gi 187939471 EU686184.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 315 18S ribosomal RNA gene	942	942	87%	0.0	98%
gi 187939458 EU686171.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 300 18S ribosomal RNA gene	942	942	87%	0.0	98%
gi 296905308 GQ254681.1	Pestalotiopsis sp. MA129 internal transcribed spacer 1, partial seque	940	940	86%	0.0	99%
gi 24417583 AF409956.1	Pestalotiopsis aquatica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; ir	940	940	85%	0.0	99%
gi 186927780 EU644755.1	Pestalotiopsis sp. PII-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; ir	937	937	85%	0.0	99%
gi 186927779 EU644754.1	Pestalotiopsis sp. PI-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; in	931	931	85%	0.0	99%

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região β -tubulina, utilizadas na comparação com o isolado BB1.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi 205824986 AB453893.1	Pestalotiopsis acaciae tub2 gene for beta tubulin, strain: TAP31008t	727	727	98%	0.0	99%
gi 311418602 HM573302.1	Pestalotiopsis gracilis strain THS-BZ beta-tubulin gene, partial seque	710	710	98%	0.0	98%
gi 311418573 HM573280.1	Pestalotiopsis palmarum strain QQ-NZ beta-tubulin gene, partial seq	710	710	98%	0.0	98%
gi 311418522 HM573242.1	Pestalotiopsis gracilis strain HHL-FG beta-tubulin gene, partial seque	710	710	98%	0.0	98%
gi 311418603 HM573303.1	Pestalotiopsis cruenta strain THS-CZ beta-tubulin gene, partial sequ	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418614 HM573310.1	Pestalotiopsis palmarum strain THS-JZ beta-tubulin gene, partial seq	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418613 HM573309.1	Pestalotiopsis cruenta strain THS-IZ beta-tubulin gene, partial seque	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418611 HM573308.1	Pestalotiopsis virgatula strain THS-HZ beta-tubulin gene, partial seq	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418607 HM573305.1	Pestalotiopsis matildae strain THS-EZ beta-tubulin gene, partial seq	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418605 HM573304.1	Pestalotiopsis virgatula strain THS-DZ beta-tubulin gene, partial seq	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418576 HM573282.1	Pestalotiopsis virgatula strain QQ-PZ beta-tubulin gene, partial sequ	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418574 HM573281.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-OZ beta-tubulin gene, partial sequer	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418572 HM573279.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-MZ beta-tubulin gene, partial sequer	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418566 HM573275.1	Pestalotiopsis aquatica strain QQ-IZ beta-tubulin gene, partial seque	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418565 HM573274.1	Pestalotiopsis virgatula strain QQ-HZ beta-tubulin gene, partial sequ	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418562 HM573272.1	Pestalotiopsis menezesiana strain QQ-FZ beta-tubulin gene, partial s	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418560 HM573270.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-DZ beta-tubulin gene, partial sequer	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418559 HM573269.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-CZ beta-tubulin gene, partial sequer	704	704	98%	0.0	98%
gi 311418513 HM573237.1	Pestalotiopsis zonata strain BGR-AY beta-tubulin gene, partial seque	704	704	98%	0.0	98%
gi 205824993 AB453895.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K01 tub2 gene for beta tubulin	704	704	98%	0.0	98%
gi 112785102 DQ787844.1	Pestalotia vaccinii strain PSHI2004Endo424 beta-tubulin gene, partia	704	704	98%	0.0	98%
gi 112785099 DQ787841.1	Pestalotiopsis virgatula strain PSHI2004Endo415 beta-tubulin gene, r	704	704	98%	0.0	98%

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região EF, utilizadas na comparação com o isolado BB1.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gil205825144 AB453839.1	Pestalotiopsis glandicola EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	781	781	98%	0.0	98%
gil205825141 AB453838.1	Pestalotiopsis japonica EF1a gene for elongation factor 1 alpha, stra	763	763	97%	0.0	97%
gil205825089 AB453852.1	Pestalotiopsis glandicola EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	762	762	97%	0.0	97%
gil205825157 AB453843.1	Pestalotiopsis acaciae EF1a gene for elongation factor 1 alpha, strai	754	754	98%	0.0	97%
gil205825133 AB453836.1	Pestalotiopsis crassiuscula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, :	754	754	98%	0.0	97%
gil205825108 AB453857.1	Pestalotiopsis longiseta EF1a gene for elongation factor 1 alpha, stra	752	752	98%	0.0	96%
gil205824931 AB453859.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K02 EF1a gene for elongation factor 1 alpha	752	752	98%	0.0	96%
gil205825163 AB453845.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K01 EF1a gene for elongation factor 1 alpha	748	748	97%	0.0	97%
gil205825087 AB453851.1	Pestalotiopsis longisetula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, st	735	735	97%	0.0	96%
gil205825155 AB453842.1	Pestalotiopsis crassiuscula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, :	690	690	97%	0.0	95%
gil308211186 HQ022659.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB229 translation elong	681	681	86%	0.0	97%
gil308211185 HQ022658.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain LA69 translation elong	681	681	86%	0.0	97%
gil308211182 HQ022655.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM87 translation elong	675	675	86%	0.0	97%
gil308211181 HQ022654.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM64 translation elong	675	675	86%	0.0	97%
gil308211180 HQ022653.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB116 translation elong	675	675	86%	0.0	97%
gil308211179 HQ022652.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IQ130 translation elong	675	675	86%	0.0	97%
gil308211178 HQ022651.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB228 translation elong	675	675	86%	0.0	97%
gil308211177 HQ022650.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM156 translation elon	675	675	86%	0.0	97%
gil308211188 HQ022661.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain PP105 translation elon	673	673	86%	0.0	97%
gil308211184 HQ022657.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain LA17 translation elong	669	669	86%	0.0	97%
gil308211183 HQ022656.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM173 translation elon	669	669	86%	0.0	97%

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região EF, utilizadas na comparação com o isolado 3HA1.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gil205825144 AB453839.1	Pestalotiopsis glandicola EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	787	787	95%	0.0	98%
gil205825141 AB453838.1	Pestalotiopsis japonica EF1a gene for elongation factor 1 alpha, stra	769	769	95%	0.0	97%
gil205825089 AB453852.1	Pestalotiopsis glandicola EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	767	767	95%	0.0	97%
gil205825157 AB453843.1	Pestalotiopsis acaciae EF1a gene for elongation factor 1 alpha, strai	760	760	95%	0.0	97%
gil205825133 AB453836.1	Pestalotiopsis crassiuscula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, :	760	760	95%	0.0	97%
gil205825108 AB453857.1	Pestalotiopsis longiseta EF1a gene for elongation factor 1 alpha, stra	758	758	95%	0.0	97%
gil205824931 AB453859.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K02 EF1a gene for elongation factor 1 alpha	758	758	95%	0.0	97%
gil205825163 AB453845.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K01 EF1a gene for elongation factor 1 alpha	748	748	95%	0.0	97%
gil205825087 AB453851.1	Pestalotiopsis longisetula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, st	740	740	95%	0.0	97%
gil205825155 AB453842.1	Pestalotiopsis crassiuscula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, :	696	696	95%	0.0	95%
gil308211186 HQ022659.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB229 translation elong	687	687	85%	0.0	97%
gil308211185 HQ022658.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain LA69 translation elong	687	687	85%	0.0	97%
gil308211182 HQ022655.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM87 translation elong	681	681	85%	0.0	97%
gil308211181 HQ022654.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM64 translation elong	681	681	85%	0.0	97%
gil308211180 HQ022653.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB116 translation elong	681	681	85%	0.0	97%
gil308211179 HQ022652.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IQ130 translation elong	681	681	85%	0.0	97%
gil308211178 HQ022651.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB228 translation elong	681	681	85%	0.0	97%
gil308211177 HQ022650.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM156 translation elon	681	681	85%	0.0	97%

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região β -tubulina, utilizadas na comparação com o isolado 3HAI.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi 205824986 AB453893.1	Pestalotiopsis acaciae tub2 gene for beta tubulin, strain: TAP31008	667	667	97%	0.0	97%
gi 85720534 DQ333572.1	Pestalotiopsis aquatica strain PSHI2002Endo389 beta-tubulin gene, r	654	654	97%	0.0	96%
gi 311418603 HM573303.1	Pestalotiopsis cruenta strain THS-CZ beta-tubulin gene, partial sequ	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418602 HM573302.1	Pestalotiopsis gracilis strain THS-BZ beta-tubulin gene, partial sequ	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418614 HM573310.1	Pestalotiopsis palmarum strain THS-JZ beta-tubulin gene, partial seq	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418613 HM573309.1	Pestalotiopsis cruenta strain THS-IZ beta-tubulin gene, partial sequ	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418611 HM573308.1	Pestalotiopsis virgatula strain THS-HZ beta-tubulin gene, partial seq	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418607 HM573305.1	Pestalotiopsis matildae strain THS-EZ beta-tubulin gene, partial sequ	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418605 HM573304.1	Pestalotiopsis virgatula strain THS-DZ beta-tubulin gene, partial seq	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418576 HM573282.1	Pestalotiopsis virgatula strain QQ-PZ beta-tubulin gene, partial sequ	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418574 HM573281.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-OZ beta-tubulin gene, partial sequer	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418573 HM573280.1	Pestalotiopsis palmarum strain QQ-NZ beta-tubulin gene, partial sequ	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418572 HM573279.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-MZ beta-tubulin gene, partial sequer	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418566 HM573275.1	Pestalotiopsis aquatica strain QQ-IZ beta-tubulin gene, partial sequ	650	650	97%	0.0	97%
gi 311418565 HM573274.1	Pestalotiopsis virgatula strain QQ-HZ beta-tubulin gene, partial sequ	650	650	97%	0.0	97%

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região ITS, utilizadas na comparação com o isolado 3HAI

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi 292397875 GU722595.1	Pestalotiopsis mangiferae isolate MM 102 18S ribosomal RNA gene, p	1148	1148	96%	0.0	99%
gi 13123767 AF346561.1	Pestalotiopsis sp. NG12-30 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1142	1142	96%	0.0	99%
gi 133872803 EF451799.1	Pestalotiopsis sp. 14JAES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	1075	1075	96%	0.0	98%
gi 133872804 EF451800.1	Pestalotiopsis microspora isolate 29SES 18S ribosomal RNA gene, par	1063	1063	96%	0.0	97%
gi 133872808 EF451804.1	Pestalotiopsis sp. SD01ES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1058	1058	96%	0.0	98%
gi 133872806 EF451802.1	Pestalotiopsis microspora isolate 6JAES 18S ribosomal RNA gene, par	1044	1044	93%	0.0	98%
gi 133872807 EF451803.1	Pestalotiopsis sp. 9JAES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	1035	1035	90%	0.0	98%
gi 260600340 GQ891045.1	Pestalotiopsis pauciseta isolate VM1 18S ribosomal RNA gene, partial	1033	1033	97%	0.0	96%
gi 300490555 GU991816.1	Uncultured Ascomycota clone 1.5 18S ribosomal RNA gene, partial se	998	998	83%	0.0	99%
gi 187939399 EU686112.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 217 18S ribosomal RNA gene	998	998	82%	0.0	99%
gi 289470136 GU395992.1	Pestalotiopsis photiniae isolate Pp.jlnd09 18S ribosomal RNA gene, p	990	990	82%	0.0	99%
gi 187939450 EU686163.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 290 18S ribosomal RNA gene	990	990	84%	0.0	99%
gi 126131214 EF423525.1	Pestalotiopsis sp. P035 internal transcribed spacer 1, partial sequenc	990	990	83%	0.0	99%
gi 218454096 FJ478120.1	Pestalotiopsis microspora strain xsd08078 18S ribosomal RNA gene, p	988	988	81%	0.0	99%
gi 284520068 GU056016.1	Uncultured Xylariales isolate BV3_03_07_19 18S ribosomal RNA gene,	987	987	82%	0.0	99%
gi 220967564 EU977292.1	Fungal endophyte sp. P813C internal transcribed spacer 1, partial se	985	985	82%	0.0	99%
gi 241017367 FJ904850.1	Pestalotiopsis sp. GR199 18S ribosomal RNA, internal transcribed spa	983	983	82%	0.0	99%
gi 75173001 DQ132823.1	Pestalotiopsis aquatica internal transcribed spacer 1, partial sequenc	981	981	81%	0.0	99%
gi 284520067 GU056015.1	Uncultured Xylariales isolate 6.38_P1 18S ribosomal RNA gene, partia	979	979	84%	0.0	98%
gi 223006282 FJ612914.1	Fungal sp. ARIZ B096 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	977	977	81%	0.0	99%
gi 223006262 FJ612894.1	Fungal sp. ARIZ B011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	977	977	81%	0.0	99%
gi 223006149 FJ612781.1	Fungal sp. ARIZ L332 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	977	977	81%	0.0	99%

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região ITS, utilizadas na comparação com o isolado 1IIG.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi 292397875 GU722595.1	Pestalotiopsis mangiferae isolate MM 102 18S ribosomal RNA gene, p	1112	1112	100%	0.0	99%
gi 13123767 AF346561.1	Pestalotiopsis sp. NG12-30 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1096	1096	100%	0.0	99%
gi 133872803 EF451799.1	Pestalotiopsis sp. 14JAES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	1035	1035	100%	0.0	97%
gi 133872808 EF451804.1	Pestalotiopsis sp. SD01ES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1017	1017	99%	0.0	97%
gi 133872804 EF451800.1	Pestalotiopsis microspora isolate 29SES 18S ribosomal RNA gene, par	1017	1017	99%	0.0	97%
gi 133872806 EF451802.1	Pestalotiopsis microspora isolate 6JAES 18S ribosomal RNA gene, par	1004	1004	96%	0.0	97%
gi 133872807 EF451803.1	Pestalotiopsis sp. 9JAES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	994	994	93%	0.0	98%
gi 260600340 GQ891045.1	Pestalotiopsis pauciseta isolate VM1 18S ribosomal RNA gene, partial	979	979	99%	0.0	96%
gi 300490555 GU991816.1	Uncultured Ascomycota clone 1.5 18S ribosomal RNA gene, partial se	965	965	86%	0.0	99%
gi 187939399 EU686112.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 217 18S ribosomal RNA gene	960	960	84%	0.0	99%
gi 218454096 FJ478120.1	Pestalotiopsis microspora strain xsd08078 18S ribosomal RNA gene, p	956	956	84%	0.0	99%
gi 289470136 GU395992.1	Pestalotiopsis photiniae isolate Pp.jlnd09 18S ribosomal RNA gene, p	954	954	83%	0.0	99%
gi 284520068 GU056016.1	Uncultured Xylariales isolate BV3_03_07_I9 18S ribosomal RNA gene,	954	954	85%	0.0	99%
gi 241017367 FJ904850.1	Pestalotiopsis sp. GR199 18S ribosomal RNA, internal transcribed spa	952	952	84%	0.0	99%
gi 220967564 EU977292.1	Fungal endophyte sp. P813C internal transcribed spacer 1, partial se	952	952	84%	0.0	99%
gi 75173001 DQ132823.1	Pestalotiopsis aquatica internal transcribed spacer 1, partial sequenc	950	950	83%	0.0	99%
gi 284520067 GU056015.1	Uncultured Xylariales isolate 6.38_P1 18S ribosomal RNA gene, partia	946	946	86%	0.0	98%
gi 223006282 FJ612914.1	Fungal sp. ARIZ B096 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; intr	944	944	84%	0.0	99%
gi 223006262 FJ612894.1	Fungal sp. ARIZ B011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; intr	944	944	84%	0.0	99%

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região β -tubulina, utilizadas na comparação com o isolado 1IIG.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi 311418603 HM573303.1	Pestalotiopsis cruenta strain THS-CZ beta-tubulin gene, partial sequ	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418614 HM573310.1	Pestalotiopsis palmarum strain THS-JZ beta-tubulin gene, partial seq	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418613 HM573309.1	Pestalotiopsis cruenta strain THS-IZ beta-tubulin gene, partial sequ	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418611 HM573308.1	Pestalotiopsis virgatula strain THS-HZ beta-tubulin gene, partial seq	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418607 HM573305.1	Pestalotiopsis matildae strain THS-EZ beta-tubulin gene, partial seq	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418605 HM573304.1	Pestalotiopsis virgatula strain THS-DZ beta-tubulin gene, partial seq	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418576 HM573282.1	Pestalotiopsis virgatula strain QQ-PZ beta-tubulin gene, partial sequ	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418574 HM573281.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-OZ beta-tubulin gene, partial sequer	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418572 HM573279.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-MZ beta-tubulin gene, partial sequer	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418566 HM573275.1	Pestalotiopsis aquatica strain QQ-IZ beta-tubulin gene, partial sequ	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418565 HM573274.1	Pestalotiopsis virgatula strain QQ-HZ beta-tubulin gene, partial sequ	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418562 HM573272.1	Pestalotiopsis menezesiana strain QQ-FZ beta-tubulin gene, partial s	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418560 HM573270.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-DZ beta-tubulin gene, partial sequer	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418559 HM573269.1	Pestalotiopsis gracilis strain QQ-CZ beta-tubulin gene, partial sequer	696	696	94%	0.0	99%
gi 311418513 HM573237.1	Pestalotiopsis zonata strain BGR-AY beta-tubulin gene, partial sequ	696	696	94%	0.0	99%
gi 205824993 AB453895.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K01 tub2 gene for beta tubulin	696	696	94%	0.0	99%
gi 112785102 DQ787844.1	Pestalotia vaccinii strain PSHI2004Endo424 beta-tubulin gene, partia	696	696	94%	0.0	99%
gi 112785099 DQ787841.1	Pestalotiopsis virgatula strain PSHI2004Endo415 beta-tubulin gene, p	696	696	94%	0.0	99%
gi 110349433 DQ657902.1	Pestalotiopsis milletiae strain PSHI2004Endo125 beta-tubulin gene, i	696	696	94%	0.0	99%
gi 110349429 DQ657898.1	Pestalotiopsis foedans strain PSHI2004Endo409 beta-tubulin gene, p	696	696	94%	0.0	99%
gi 110349424 DQ657893.1	Pestalotia cinchonae strain PSHI2004Endo165 beta-tubulin gene, par	696	696	94%	0.0	99%

Sequências das espécies retiradas do *Genbank*, região EF, utilizadas na comparação com o isolado 1IIIG.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gil205825144 AB453839.1	Pestalotiopsis glandicola EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	765	765	96%	0.0	98%
gil205825108 AB453857.1	Pestalotiopsis longiseta EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	763	763	97%	0.0	98%
gil205824931 AB453859.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K02 EF1a gene for elongation factor 1 alpha	763	763	97%	0.0	98%
gil205825089 AB453852.1	Pestalotiopsis glandicola EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	762	762	98%	0.0	98%
gil205825141 AB453838.1	Pestalotiopsis japonica EF1a gene for elongation factor 1 alpha, str	754	754	96%	0.0	98%
gil205825087 AB453851.1	Pestalotiopsis longisetula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, st	746	746	98%	0.0	97%
gil205825133 AB453836.1	Pestalotiopsis crassiuscula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, :	744	744	96%	0.0	98%
gil205825163 AB453845.1	Pestalotiopsis sp. TAP08K01 EF1a gene for elongation factor 1 alpha	742	742	96%	0.0	98%
gil205825157 AB453843.1	Pestalotiopsis acaciae EF1a gene for elongation factor 1 alpha, strai	719	719	98%	0.0	96%
gil205825155 AB453842.1	Pestalotiopsis crassiuscula EF1a gene for elongation factor 1 alpha, :	714	714	97%	0.0	96%
gil308211182 HQ022655.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM87 translation elonç	708	708	87%	0.0	99%
gil308211181 HQ022654.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM64 translation elonç	708	708	87%	0.0	99%
gil308211180 HQ022653.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB116 translation elonç	708	708	87%	0.0	99%
gil308211179 HQ022652.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IQ130 translation elonç	708	708	87%	0.0	99%
gil308211178 HQ022651.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB228 translation elonç	708	708	87%	0.0	99%
gil308211177 HQ022650.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM156 translation elor	708	708	87%	0.0	99%
gil308211191 HQ022664.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain CM177 translation elor	704	704	85%	0.0	99%
gil308211186 HQ022659.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain IB229 translation elonç	702	702	87%	0.0	98%
gil308211185 HQ022658.1	Pestalotiopsis cf. microspora ROG-2010 strain LA69 translation elonç	702	702	87%	0.0	98%